

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/20036 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 38/17, C07K 14/47, C12Q 1/68, G01N 33/574 (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GRESS, Thomas [DE/DE]; Hauptstrasse 79a, 89275 Elchingen (DE).  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02948 ADLER, Guido [DE/DE]; Zeppelinstrasse 7, 89075 Ulm (DE).  
(22) Internationales Anmeldedatum: 1. August 2001 (01.08.2001) (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).  
(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch  
(30) Angaben zur Priorität:  
100 43 964.0 6. September 2000 (06.09.2000) DE  
101 06 829.8 14. Februar 2001 (14.02.2001) DE  
(71) Anmelder und  
(72) Erfinder: MÜLLER, Friederike [DE/DE]; Rohrweg 12, 89079 Ulm-Göggingen (DE).  
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

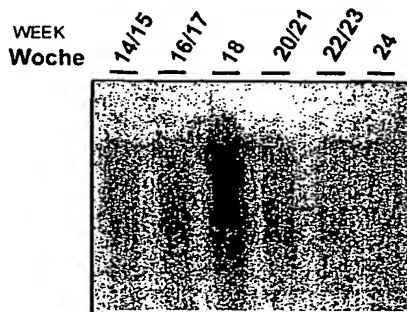
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MEDICAMENT COMPRISING A DNA SEQUENCE, WHICH CODES FOR THE RNA-BINDING KOC PROTEIN, AND COMPRISING A KOC PROTEIN OR A DNA SEQUENCE OF THE KOC PROMOTER

(54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL MIT EINER FÜR DAS RNA-BINDENDE KOC-PROTEIN KODIERENDEN DNA-SEQUENZ, EINEM KOC-PROTEIN ODER EINER DNA-SEQUENZ DES KOC-PROMOTORS

KOC EXPRESSION DURING THE DEVELOPMENT OF  
THE HUMAN PANCREAS

### KOC Expression während der humanen Pankreasentwicklung



(57) Abstract: The invention relates to a medicament containing an RNA-binding protein KOC or a DNA sequence that codes this protein. The invention also relates to a diagnostic method with regard to tumors associated with expression of KOC, and to different applications of the inventive medicament, preferably for artificially inducing the pluripotentiality of body cells. The invention additionally relates to a DNA sequence of the KOC promoter, whereby the KOC promoter is characterized in that it is only activated in embryonic tissues or malignant tumors, and, finally, relates to different applications of the KOC promoter.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/20036 A1



TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**(57) Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Arzneimittel, das ein RNA-bindendes Protein KOC oder eine dieses Protein kodierende DNA-Sequenz enthält. Beschrieben werden ferner ein Diagnoseverfahren hinsichtlich von mit Expression von KOC assoziierten Tumoren sowie verschiedene Verwendungen des erfindungsgemäßen Arzneimittels, vorzugsweise zum künstlichen Herbeiführen der Pluripotenz von Körperzellen. Beschrieben wird auch eine DNA-Sequenz des KOC-Promotors, wobei der KOC-Promotor dadurch gekennzeichnet ist, daß er nur in embryonalen Geweben oder malignen Tumoren aktiviert wird, sowie verschiedene Verwendungen des KOC-Promotors.

**Arzneimittel mit einer für das RNA-bindende KOC-Protein kodierenden DNA-Sequenz, einem KOC-Protein oder einer DNA-Sequenz des KOC-Promotors**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Arzneimittel, das ein RNA-bindendes Protein KOC oder eine für dieses Protein kodierende DNA-Sequenz, vorzugsweise auf einem Vektor inseriert, enthält. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Diagnoseverfahren hinsichtlich von mit der Expression von KOC assoziierten malignen Tumoren sowie verschiedene Verwendungen des erfindungsgemäßen Arzneimittels, vorzugsweise zum künstlichen Herbeiführen der Pluripotenz von Körperzellen. Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch eine DNA-Sequenz des KOC-Promotors, wobei der KOC-Promotor dadurch gekennzeichnet ist, daß er nur in embryonalen Geweben oder malignen Tumoren aktiviert wird, sowie verschiedene Verwendungen des KOC-Promotors.

Der Ausfall einzelner Organe oder differenzierter Zellen innerhalb eines Organs ist Ursache vieler Erkrankungen, die bis heute kaum einer Therapie zugänglich sind. Trotz medizinisch-technischer Fortschritte in der Transplantationsmedizin ist etwa der Mangel an Spenderorganen Grund für das jährliche Sterben von Tausenden von Patienten. Darüber hinaus ist die Funktionsfähigkeit der transplantierten Organe nur durch eine kontinuierliche postoperative Immunsuppression, die z.T. mit gravierenden Nebenwirkungen verbunden ist, zu gewährleisten.

Aus diesen Gründen ist die Entwicklung neuer Technologien zur Regeneration erkrankter Organe oder zur Rekonstitution von Organen zum Schwerpunkt in der medizinischen Forschung geworden. Dabei ist eine Nutzung körpereigener zellulärer Entwicklungs- und Differenzierungspotentiale für therapeutische Ansätze Ziel dieser neuen Behandlungsstrategien. Hierbei wird nach passenden

Methoden gesucht, die zur Erlangung von Zelldifferenzierung und Proliferation unter Erhalt der Funktion des einzelnen Zelltyps führen, ohne ein transformierendes Potential zu besitzen. Damit könnte es zukünftig möglich sein, aus z.B. durch Biopsien gewonnenem, gesunden Zellmaterial von Patienten durch gezielte Manipulation und Kultivierung Stammzellpopulationen zu generieren, aus denen sich auf Grund ihres Proliferationspotentials spezifische und differenzierte Zellen entwickeln können. Dadurch könnten schließlich Engpässe an soliden Ersatzorganen in der Transplantationsmedizin behoben werden.

Der koordinierte Ablauf eines komplexen zellulären Differenzierungsprogramms, der letztendlich zur Entwicklung eines funktionsfähigen Organs führt, ist aber ein bislang weitgehend ungelöstes Problem (Lanza et al., *Nature Medicine* 5, No. 9 (1999), 975-977; Vogel, G., *Science* 283 (1999), 1432-1434; Solter et al., *Science* 283 (1999), 1468-1470). Eine Verwirklichung dieses Konzeptes erscheint nur greifbar in Fällen, in denen eine differenzierte Einzelzelle letztlich "Organfunktion" determiniert, wie z.B. die Insulin-produzierende Beta-Zelle der Bauchspeicheldrüse oder im Falle von Antikörper-produzierenden B-Zellen, sowie bei Vorläuferzellen des Knochenmarks, die durch spezifische Wachstumsfaktoren differenziert werden können.

Gegenstand intensiver Forschung ist somit die Erarbeitung neuer Methoden zur Entwicklung von funktionsfähigen Organen, Geweben und Stammzellen zu Transplantationszwecken. Dazu wurden bereits einzelne Gene identifiziert, die bei der Steuerung von Entwicklungsprozessen essentiell sind. Weiterhin ist es gelungen, teilungsfähige, nicht differenzierte Zellen (embryonale Stammzellen, ES-Zellen) zu isolieren, die durch einen Transfer bestimmter Gene gezielt differenziert werden können. Beispielsweise können durch die Behandlung mit dem "bone morphogenetic protein 4" (bmp4) ES-Zellen zu mesenchymalen Zellen differenzieren. Darüber hinaus können diese Zellen durch definierte Kulturbedingungen ebenfalls derart manipuliert werden, so dass dreidimensionale, gewebeähnliche Strukturen mit organspezifischem Expressionsmuster

entwickelt werden. Ein weiteres Beispiel für die Pluripotenz von Stammzellen zeigt sich darin, dass es gelungen ist, neuronale Stammzellen in Mäuse mit zerstörtem Knochenmark zu implantieren, die dort zu Blutzellen ausdifferenzieren.

Bisher ist jedoch noch nicht eine kontrollierte Reprogrammierung adulter, ausdifferenzierter Zellen zu ES-Zellen so gelungen, dass dies medizinisch vertretbar ist, da beispielsweise ES-Zellen der Maus per se tumorigen sind und, wenn sie in adulte Mäuse injiziert werden, Teratokarzinome bilden können. Auf den humanen Bereich übertragen, ist dieses Prozedere außerdem nicht nur technisch sehr aufwendig, sondern berührt auch ethische Aspekte, da für dieses Verfahren humane Blastozysten oder Säugeroozyten benötigt werden ("Therapeutic Cloning").

Somit liegt der Erfindung im wesentlichen das technische Problem zugrunde, Mittel bereitzustellen, mit denen eine Dedifferenzierung eines ausgereiften Zelltyps in einen embryonalen Phänotyp, der teilungsfähig ist, aber noch Merkmale der jeweiligen differenzierten Zelle trägt, ermöglicht wird.

Die Lösung dieses technischen Problems wurde durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Im Rahmen einer Untersuchung der differentiellen Genexpression beim Pankreaskarzinom wurde ursprünglich ein Gen kloniert, welches für ein RNA-bindendes Protein der KH-Familie kodiert, daher erhielt es den Namen KOC (KH domain containing protein overexpressed in cancer) (Müller-Pillasch et al., *Oncogene* 14 (1997), 2729-2733). KOC wird nur im Pankreaskarzinom, nicht aber im normalen Pankreasgewebe oder bei der chronischen Pankreatitis exprimiert. Das Gen kodiert für ein 69 kDa Protein mit vier KH-Domänen ("hnRNP K homologous"); siehe Figur 1. Die Sequenz ist in der NCBI-Datenbank unter der Accession No. U97188 hinterlegt.

KH-Domänen sind hochkonservierte, funktionell bedeutsame Strukturen RNA-bindender Proteine, die für eine direkte mRNA-Bindung verantwortlich sind. Untersuchungen konnten zeigen, daß RNA-bindende Proteine eine zentrale Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression spielen. In dieser Funktion sind RNA-bindende Proteine essentiell für Regulation von Wachstum und Entwicklung. Beispiele dafür sind Musterbildung und zelluläre Differenzierung während der embryonalen Entwicklung.

Zwei Mechanismen der posttranskriptionellen Genregulation durch KH-Domänen enthaltende Proteine sind die Kontrolle der mRNA-Stabilität und die spezifische subzelluläre Lokalisierung der mRNA. Obwohl bereits eine Anzahl von KH-Domänen enthaltenden Proteinen identifiziert worden sind, konnte bisher für kein KH-Protein gezeigt werden, dass dieses in der Lage ist, den Phänotyp differenzierter Zellen in einen Phänotyp unreifer, entdifferenzierter, teilungsfähiger Zellen zu revertieren und sich somit als mögliches Therapeutikum zur Herstellung von syngenischen Stammzellpopulationen eignet, die große Zahlen teilungsfähiger, spezifisch differenzierbarer Zellen zur Verfügung stellen.

Es konnte in der vorliegenden Erfindung gezeigt werden, dass mit Hilfe des Gens, das für das RNA-bindende Protein KOC kodiert, die vorstehend beschriebenen Probleme gelöst werden können. Mit dem RNA-bindenden Protein KOC ist eine Dedifferenzierung eines ausgereiften Zelltyps in einen embryonalen Phänotyp, der aber noch Merkmale der jeweiligen differenzierten Zelle trägt, möglich, so dass eine Generierung von Stammzellen eines beliebigen Zelltyps im gleichen Organismus erzeugt werden kann. Dabei revertiert das KOC-Gen den Phänotyp differenzierter Zellen in einen Phänotyp unreifer, entdifferenzierter, teilungsfähiger Zellen. Somit eignet sich das RNA-bindende Protein KOC als mögliches Therapeutikum zur Herstellung von syngenischen Stammzellpopulationen, die große Zahlen teilungsfähiger, spezifisch differenzierbarer Zellen zur

Verfügung stellen, die dann z.B. im Bereich der Transplantationsmedizin und Onkologie, bis hin zur Entwicklung biologisch funktioneller Ersatzorgane, zum Einsatz kommen können. Weiterhin kann das RNA-bindende Protein KOC zur Beeinflussung von physiologischen oder durch physikalische Noxen induzierten Alterungsprozessen, z.B. der menschlichen Haut, eingesetzt werden.

Die Untersuchungen wurden an pre-B-Zellen durchgeführt und durch Genmanipulation dieser differenzierten Zellen mit KOC konnten diese in einen undifferenzierten Zustand, der einer früheren, embryonalen Vorläuferform oder Stammzellen dieser Zellen entspricht, überführt werden. So konnte am pre B-Zell-Modell gezeigt werden, dass beispielsweise die DNA-Synthese der KOC/p210 Zellen im Vergleich zu jener der p210 Zellen deutlich stärker ist und dass die KOC/p210 Zellen im Vergleich zu den p210 Zellen eine Vielzahl von embryonalen Markern hochregulieren, respektive Marker, die adulte pre-B-Zellen von fötalen pre-B-Zellen unterscheiden, herunterregulieren. Mit dem KOC-Gen "rückdifferenzierte" Zellen sind gegen durch Bestrahlung und Dexamethason induzierten Zelltod deutlich unempfindlicher als unbehandelte Zellen. Darüber hinaus treten diese Zellen wieder in den Zellzyklus ein und proliferieren. KOC unterscheidet sich damit fundamental von bisher verwendeten konventionellen Wachstumsfaktoren, die stets nur die Proliferation eines differenzierten Zelltyps anregen oder einen Zelltyp zu einem malignen Phänotyp transformieren. Aus den genannten Eigenschaften ergeben sich zahlreiche potentielle Anwendungen für KOC in der Transplantationsmedizin und Krebsbehandlung. Der Einsatz von KOC ist für die Entwicklung neuer Techniken zur Wiederherstellung und Regeneration geschädigter Organe von Bedeutung (Organersatz), insbesondere auf der Ebene der Generation typspezifischer syngener Stammzellen und künstlicher Gewebe, wie bei Erkrankungen, wie Alzheimer (neuronale Stammzellen), Diabetes (pre-Beta-Zellen), Herzinsuffizienz (Vorläufer von Herzmuskelzellen), Leber (Vorläufer von Hepatozyten). Weiterhin kann der Einsatz von KOC bei Hautverletzungen, wie z.B. Verbrennungen, in Zukunft durch die Induktion rascher extrakorporaler Vermehrung von

Hautzellen zu Transplantationszwecken von Bedeutung sein.

Zusammengefaßt ergeben sich somit für KOC (entweder im Rahmen einer Gentherapie oder als Proteinverabreichung) u.a. folgende Einsatzbereiche:

- (1) Erzielung einer Resistenz differenzierter Zellen gegen durch verschiedene Noxen induzierten Zelltod (z. B. Bestrahlung), und
- (2) Überführung von Zellen von einem differenzierten, nicht proliferationsfähigen in einen undifferenzierten, proliferationsfähigen Vorläuferzustand, der aber noch deutliche Merkmale des differenzierten Phänotyps trägt, und damit nach Expansion der Zellpopulation durch Abschalten der KOC Expression die Rückdifferenzierung in den Ausgangszelltyp ermöglicht. Damit wird syngen, also im gleichen Organismus, die unbeschränkte Gewinnung von Stammzellen eines beliebigen Zelltyps und somit auch die unbeschränkte Gewinnung differenzierter, z.T. nicht oder nur sehr gering teilungsfähiger Zellen in jedem Lebensalter möglich.

Somit ist für die vorstehend beschriebenen Zwecke die Verabreichung von KOC selbst oder des für dieses Protein kodierenden Gens von Nutzen. Andererseits kann auch die Möglichkeit der Inaktivierung von KOC bei Erkrankungen, die mit einer zu hohen Aktivität von KOC oder einer zu hohen Expression des Gens einhergehen, therapeutisch sinnvoll sein. Eine solche Inaktivierung kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen, beispielsweise auf genetischer Ebene ("Knock out", Hemmung der Translation durch Antisense-RNAs, Ribozyme oder Aptamere) oder Proteinebene (über hemmende Liganden, beispielsweise Antikörper oder Antagonisten etc).

Außerdem wurde im Rahmen der zu der vorliegenden Erfindung führenden Untersuchungen auch die DNA-Sequenz des KOC-Promotors kloniert und sequenziert, wobei es sich zeigte, daß dieser nur in embryonalem Gewebe oder malignen Tumoren aktiviert wird.



Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine DNA-Sequenz des KOC-Promotors, die die in Figur 9 gezeigte Nucleinsäuresequenz umfaßt oder eine davon abweichende Nucleinsäuresequenz, deren biologische Funktion im wesentlichen der des KOC-Promotors entspricht.

Der in der vorliegenden Erfindung in Zusammenhang mit dem KOC-Promotor verwendete Ausdruck "eine davon abweichende Nucleinsäuresequenz" betrifft jede Nucleinsäuresequenz, die sich von der in Figur 9 dargestellten Nucleinsäuresequenz durch die Deletion, Addition oder Substitution von Basen unterscheidet, wobei jedoch die biologische Funktion des Promotors erhalten bleibt, d.h. die Transkription eines Gens steuern zu können, wobei der Promotor im wesentlichen nur in embryonalem Gewebe oder malignen Tumoren aktiviert wird. Vorzugsweise handelt es sich bei den abweichenden Nucleinsäuresequenzen um mit der in Figur 9 gezeigten Nucleinsäuresequenz hybridisierende Nucleinsäuresequenzen, wobei hinsichtlich des Begriffs "hybridisieren" auf die nachstehende Definition verwiesen wird, oder Fragmente der in Figur 9 gezeigten Nucleinsäuresequenz. Vorzugsweise sind die "abweichenden Nucleinsäuresequenzen" zu 70%, mehr bevorzugt zu 80% und am meisten bevorzugt zu 90% identisch mit der DNA-Sequenz von Figur 9.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Arzneimittel, das eine DNA-Sequenz enthält, die für ein RNA-bindendes Protein KOC mit der in Figur 1 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert, oder eine DNA-Sequenz, die die in Figur 1 gezeigte Nucleinsäuresequenz enthält. Die DNA-Sequenz ist vorzugsweise cDNA.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Arzneimittel, das eine DNA-Sequenz des erfindungsgemäßen KOC-Promotors enthält oder eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit den biologischen Eigenschaften eines RNA-bindenden Proteins KOC kodiert, wobei sich diese DNA-Sequenz von der DNA-Sequenz von Figur 1 in der Codonsequenz aufgrund der Degeneration des

genetischen Codes unterscheidet, mit den vorstehenden DNA-Sequenzen hybridisiert oder die ein Fragment, eine allelische Variante oder eine andere Variante der vorstehenden DNA-Sequenzen ist.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff "hybridisiert" bezieht sich auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen als Lösung 6xSSC, 1% SDS, 1xDenhardts-Lösung verwendet wird und die Hybridisierungstemperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 45°C liegen. Nach der Hybridisierung wird vorzugsweise mit 2xSSC, 1% SDS oder mit 0,2xSSC (stringente Bedingungen) bei Temperaturen zwischen 40°C und 75°C, vorzugsweise bei 50°C gewaschen (zur Definition von SSC und Denhardts-Lösung siehe Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Besonders bevorzugt sind stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, oder Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1 - 6.3.6 beschrieben sind.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe "Variante" oder "Fragment" umfassen DNA-Sequenzen, die sich gegenüber den in Figur 1 angegebenen Sequenzen durch Deletion(en), Insertion(en), Austausch(e) und/oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen unterscheiden bzw. ein Fragment des ursprünglichen Nucleinsäuremoleküls umfassen, wobei das durch diese DNA-Sequenzen kodierte Protein noch die biologischen Eigenschaften des RNA-bindenden Proteins aufweist und in Säugern biologisch aktiv ist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der DNA-Sequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., supra. Der Fachmann ist auch in der Lage zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten DNA-Sequenz kodierte Protein noch über die biologischen Eigenschaften des RNA-bindenden Proteins KOC verfügt. Nachstehend werden alle

diese DNA-Sequenzen allgemein mit dem Begriff "KOC-DNA-Sequenzen" bezeichnet.

Durch die Erniedrigung oder Hemmung der Expression der vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen, kann die Synthese der von diesen codierten Proteine verringert oder eliminiert werden, was beispielsweise bei bestimmten Krankheitszuständen wünschenswert ist. Daher betrifft eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung Antisense-RNA, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie zu den vorstehenden DNA-Sequenzen komplementär ist und die Synthese des von diesen DNA-Sequenzen codierten Proteins verringern oder hemmen kann und ein Ribozym, das dadurch gekennzeichnet, daß es zu einem Teil der vorstehenden DNA-Sequenzen und an die von diesen DNA-Sequenzen transkribierte RNA spezifisch binden und diese spalten kann, wodurch die Synthese des von diesen DNA-Sequenzen codierten Proteins verringert oder gehemmt wird. Vorzugsweise sind diese Antisense-RNAs und Ribozyme zu einer codierenden Region der mRNA komplementär. Der Fachmann ist in der Lage, ausgehend von den offenbarten DNA-Sequenzen, geeignete Antisense-RNAs herzustellen und anzuwenden. Geeignete Vorgehensweisen sind beispielsweise in EB-B1 0 223 399 oder EP-A1 0 458 beschrieben. Ribozyme sind RNA-Enzyme und bestehen aus einem einzelnen RNA-Strang. Diese können andere RNAs intermolekular spalten, beispielsweise die von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen transkribierten mRNAs. Diese Ribozyme müssen prinzipiell über zwei Domänen verfügen, (1) eine katalytische Domäne und, (2) eine Domäne, die zu der Ziel-RNA komplementär ist und an diese binden kann, was die Voraussetzung für eine Spaltung der Ziel-RNA ist. Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen ist es inzwischen möglich, spezifische Ribozyme zu konstruieren, die eine gewünschte RNA an einer bestimmten, vorgewählten Stelle schneiden (siehe beispielsweise Tanner et al., in: Antisense Research and Applications, CRC Press, Inc. (1993), 415-426).

Die das RNA-bindende Protein KOC bzw. das verwandte Protein kodierenden DNA-Sequenzen bzw. die für die vorstehend beschriebenen Antisense-RNAs oder Ribozyme codierenden DNAs können auch in einen Vektor, vorzugsweise Expressionsvektor, inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese Vektoren bzw. Expressionsvektoren enthaltende Arzneimittel. Die Bezeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (pUC18, pBR322, pBlueScript etc.), auf ein Virus oder ein anderes geeignetes Vehikel. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße DNA-Molekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Prokaryoten, beispielsweise E.coli, zählen der lac-, trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Expression in Eukaryoten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe und der CMV-, SV40-, RSV, MetallothioneinI- und Polyhedrin-Promotor, CMV- oder SV40-Enhancer für die Expression in tierischen Zellen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind außerdem beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Weitere Beispiele für geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor. Zu geeigneten Expressionsvektoren für E.coli zählen beispielsweise pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Zu den für die Expression in Hefe geeigneten Vektoren zählen pY100 und Ycpad1, für die Expression in Säugerzellen pMSXND, pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 sowie von pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo und pHyg stammende Vektoren. Zu den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren zählen auch von Baculovirus abgeleitete Vektoren für die Expression in Insektenzellen, beispielsweise pAcSGHisNT-A.

Vorzugsweise werden die vorstehend beschriebenen KOC-DNA-Sequenzen, die auch eine DNA-Sequenz des KOC-Promotors umfassen können, in einen für die Gentherapie geeigneten Vektor inseriert, beispielsweise unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, und in die Zellen eingeschleust. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen enthaltende Vektor ein Virus, beispielsweise ein Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Retrovirus. Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV. Für die Gentherapie geeignete Vektoren sind außerdem in WO 93/04701, WO 92/22635, WO 92/20316, WO 92/19749 und WO 92/06180 offenbart. Für Zwecke der Gentherapie können die vorstehend beschriebenen KOC-DNA-Sequenzen auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., *Biotechniques* 6 (1988), 682). Schließlich können die KOC-DNA-Sequenzen bzw. das KOC-Protein lokal z.B. in Form einer Creme, Salbe etc. verabreicht werden.

Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die für das RNA-bindende Protein KOC kodierende DNA-Sequenzen und/oder eine DNA-Sequenz des KOC-Promotors und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise *in vitro*-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie *in vivo*-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., *supra*, beschrieben sind. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden, so daß KOC beispielsweise in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann. Der Fachmann kennt auch Verfahren zur rekombinanten Herstellung von KOC, d.h. die Kultivierung geeigneter Wirtszellen unter Bedingungen, die die Expression des Proteins (bzw. Fusionsproteins) erlauben (vorzugsweise stabile Expression), und die Gewinnung des Proteins aus der Kultur oder aus den Wirtszellen. Geeignete

Reinigungsverfahren (beispielsweise präparative Chromatographie, Affinitätschromatographie, beispielsweise Immunoaffinitätschromatographie, HPLC etc.) sind ebenfalls allgemein bekannt.

Ein wesentliches Ziel in der Diagnostik von malignen Erkrankungen ist die spezifische und sensitive Erkennung früher maligner Veränderungen. Dazu werden zum Beispiel in epithelialen Tumoren mehr und mehr Genmutationen, die im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz auftreten, herangezogen. Nachteil dieser Verfahren ist, daß teilweise Genmutationen in normalen Geweben auftreten, wie zum Beispiel bei ki-ras in normalen Pankreasgeweben oder in stark entzündlich veränderten Geweben, was eine Unterscheidung zwischen chronisch, entzündlichen oder tumorösen Geweben, die therapeutisch von größter Bedeutung sind, unmöglich macht. Ziel der Forschung ist deshalb, Gene zu identifizieren, die ausschließlich in malignen entarteten Zellen exprimiert/hochreguliert sind und sich damit zur zweifelsfreien Tumordiagnostik eignen.

Wie bereits vorstehend diskutiert, wird KOC im Pankreaskarzinom, nicht jedoch aber im normalen Pankreasgewebe oder bei chronischer Pankreatitis exprimiert. Dieser Befund, daß KOC nur in malignen Geweben (Organen bzw. Zellen) nicht aber in benignen Geweben exprimiert wird, hat sich vielfach bei den unterschiedlichsten Geweben bzw. Krebsarten bestätigt. Es wird auf Tab. 1 verwiesen. KOC eignet sich deshalb, um differentialdiagnostisch zwischen Malignität und Benignität, z.B. bei Entzündung, eines Gewebes, vorzugsweise von Pankreas oder Colon, unterscheiden zu können. Ganz besonders zeichnet sich KOC dadurch aus, daß seine Expression sehr früh in der Krebsentstehung nachweisbar ist, lange bevor noch irgendwelche Auto-Antikörper gegen KOC gebildet werden (können). Desweiteren ermöglicht KOC die Unterscheidung von verschiedenen Malignitäts-Stadien, insbesondere bei Pankreas- und Colonkarzinom. Hierbei hat sich gezeigt, daß die KOC-Expression mit der Schwere der Dysplasie zunimmt. KOC stellt somit einen universell einsetzbaren

Tumorindikator dar. Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch Diagnoseverfahren zum Nachweis eines mit der Expression von KOC assoziierten malignen Tumors bzw. seiner Vorstufen, bei denen man eine Probe mit einer zur spezifischen Hybridisierung mit der von einer KOC-DNA-Sequenz transkribierten mRNA geeigneten Sonde oder einem Primer oder einem Antikörper gegen das KOC Protein oder einem Fragment davon in Berührung bringt und sodann direkt oder indirekt bestimmt, ob sich die Konzentration von KOC und/oder der KOC-mRNA in der Probe im Vergleich zu einer Kontrollprobe unterscheiden. Der Fachmann kennt Verfahren zur geeigneten Probeentnahme und auch geeignete Kontrollproben. Vorzugsweise handelt es sich bei der Kontrollprobe um ein Gewebe, das dem gleichen Gewebe wie dem vom Tumor befallenen Gewebe entspricht, jedoch von einer gesunden Quelle stammt. Eine im Vergleich zu der Kontrollprobe erhöhte KOC-Expression ist ein diagnostisches Anzeichen für einen Tumor oder eine Prädisposition für einen Tumor. Die für dieses Diagnoseverfahren verwendbaren Sonden umfassen auf den KOC-DNA-Sequenzen basierende Primer, beispielsweise für eine PCR, RT-PCR oder eine Aptamerdiagnostik (SELEX-Verfahren). Vorzugsweise sind die Sonden (oder Primer) Oligonukleotide, die einen Nukleinsäure-Bereich umfassen, der unter stringenten Bedingungen mit mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15 aufeinanderfolgende Nucleotiden der Sequenz von Figur 1 oder natürlich vorkommenden Varianten davon hybridisiert. Die Sonde (bzw. der Primer) kann auch eine Markierung tragen, z.B. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Der Fachmann kennt auch Bedingungen, die es erlauben, dass bei der PCR etc. nur die KOC-mRNA nicht jedoch die KOC-DNA amplifiziert wird bzw. zwischen DNA-Amplifikationsprodukten und mRNA-Amplifikationsprodukten unterschieden werden kann, z.B. durch Behandlung der Probe mit DNase oder durch Verwendung von Primern, die auch zur Amplifikation von Intron-Bereichen führen, somit ein DNA-Amplifikat im Vergleich zum mRNA-Amplifikat länger ist. Alternativ kann auch ein oligo(dT)-verankerter Primer für PCR, RT-PCR etc. verwendet werden.

Die Antikörper für das erfindungsgemäße Diagnoseverfahren können monoklonale, polyklonale oder synthetische Antikörper sein oder Fragmente davon. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff "Fragment" alle Teile des monoklonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder "single chain Fv"-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Antikörpern um monoklonale Antikörper. Diese Antikörper können gemäß Standardverfahren hergestellt werden, wobei vorzugsweise das KOC-Protein oder ein (synthetisches) Fragment davon als Immunogen dienen. Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Differentialdiagnose zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom.

Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung einen diagnostischen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens, der eine zur spezifischen Hybridisierung mit einer von einer KOC-DNA-Sequenz transkribierten mRNA geeignete Sonde oder einen Primer und/oder einen anti-KOC-Antikörper oder ein Fragment davon enthält. Je nach Ausgestaltung des diagnostischen Kits können die Probe oder die Sonde bzw. der Primer bzw. der Antikörper oder das Fragment davon immobilisiert sein. Die Antikörper können beispielsweise in Immunoassays auch in Flüssigphase vorliegen. Dabei können die Antikörper auf verschiedene Art und Weise markiert sein. Geeignete Marker und Markierungsverfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt. Beispiele für Immunoassays sind ELISA und RIA.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel erlaubt die Durchführung einer Reihe von (therapeutischen) Maßnahmen. Vorzugsweise ist das Arzneimittel mit einem geeigneten Träger kombiniert. Geeignete Träger und die Formulierung



derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Verabreichung der Arzneimittel kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Verbindungen (KOC-DNA-Sequenzen/KOC-Protein) zum künstlichen Herbeiführen der Pluripotenz von Körperzellen. Dies ist z.B. für die Entwicklung von Ersatzorganen von Bedeutung, insbesondere für die Erzeugung von künstlichem Pankreas-, Leber- oder Nervengewebe. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der vorstehenden Verbindungen für die Herstellung von Geweben oder Organen über die Differenzierung von Stammzellpopulationen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der vorstehend beschriebenen Verbindungen (KOC-DNA-Sequenzen/KOC-Protein) für die Verbesserung der ex-vivo-Expansion hämatopoetischer Stammzellen, z.B. für autologe Knochenmarktransplantationen. Insbesondere können syngene Vorläuferzellen ohne "Purging" erzeugt werden. Damit werden autologe Transplantationen in viel größerem Umfang als bisher möglich. Die zu expandierenden Zellen können vorher im FACS (Fluorescence activated Cell Sorting) eindeutig charakterisiert werden, so dass eine Expansion maligner Zellen ausgeschlossen ist. Immunologische Probleme, die bei allogener Transplantation vielfach auftreten, sind ausgeschlossen. Probleme und Komplikationen einer verzögerten Regeneration des Marks auf Grund einer zu geringen Zahl der reinfundierten Stammzellen, wie z.B. bei Sepsis oder lebensbedrohliche Pilzinfektionen, entfallen, da die Menge an Stammzellen, die zur Verfügung stehen, beliebig determinierbar ist. Somit wird aber auch eine

weitere Dosis-Erhöhung bei der Chemotherapie möglich, da die endogene Stammzellpopulation nicht mehr ausschließlich für die Regeneration des Marks benötigt wird. Damit ist ein Einsatz des Verfahrens bei der Hochdosis-Chemotherapie mit wiederholter Gabe von Chemotherapie und Reinfusion von autologen Knochenmarksstammzellen von Nutzen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der vorstehenden Verbindungen zur Hochdosis-Chemotherapie.

Ein weiterer therapeutischer Effekt besteht in der Tatsache, dass KOC-Stammzellen, solange das Protein exprimiert wird, unempfindlicher gegen Chemo- oder Strahlentherapie sind. D.h. unter Therapie bei Expression von KOC wird die Zahl der erforderlichen Reinfusionen von expandierenden Stammzellen geringer. Die anschließende Abschaltung von KOC kann dann nach Abschluß der Chemotherapie oder Strahlentherapie die normale Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Noxen/apoptotische Stimuli wieder herstellen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der vorstehenden Verbindungen zur Erzeugung eines prophylaktischen Effekts bei Chemo- oder Strahlentherapie.

Da es sich in Expressionsanalysen zeigte, dass nicht nur die mRNA von KOC auf Nukleinsäureebene sondern auch das Protein mittels eines spezifischen Antikörpers entsprechend nachgewiesen werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein als solches seine spezifische Wirkung auf die jeweiligen Zellen entfaltet. Deshalb ist auch die Anwendung von KOC an Hautzellen, vorzugsweise durch in Cremes gelöstes Protein, vorteilhaft. Da insbesondere bei einer topischen Anwendung von KOC in Cremes oder Lotionen nur oberflächliche Hautschichten erreicht werden, ist nicht von einer nachhaltigen proliferationsfördernden (Neben-)Wirkung auf die gesamte Dermis

auszugehen. Vielmehr wird ein nachhaltiger Effekt nur in den oberen Hautschichten erzielt, die durch Exposition gegenüber Umwelteinflüssen (UV) besonders geschädigt werden und maligne entarten können (Spinaliom, Basaliom). Damit ist ein therapeutisch-prophylaktischer Effekt von KOC bei strahlenexponierter Haut - auch im Rahmen therapeutischer Bestrahlungen von Körperregionen mit Gammastrahlern - gegeben.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der vorstehenden Verbindungen zur Erzeugung eines prophylaktischen Effekts bei strahlenexponierter Haut.

Desweiteren kann bei einer allogenen Knochenmarktransplantation das Donormark mit KOC transfiziert werden. Es ist dann nach der Transplantation mit einem schnelleren und komplikationsloseren Engraftment zu rechnen. Dies ergibt sich auch aus den Ergebnissen von ersten Knochenmarktransplantationen, die im Rahmen dieser Erfindung an Mäusen durchgeführt wurden. Mark, das mit KOC transfiziert wurde, zeigte ein deutlich schnelleres Engraftment.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der vorstehenden Verbindungen für die Verbesserung des Engraftments bei allogenen Knochenmarktransplantationen.

Darüberhinaus kann der Einsatz von KOC auch zu der Verlangsamung bzw. Umkehrung von Alterungsvorgängen beitragen, wobei es sich bei den Alterungsvorgängen vorzugsweise um Alterungsvorgänge im Bereich des Gefäßendothels, von Neuronen, Keratinozyten und Myozyten handelt.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der vorstehenden Verbindungen für die Verlangsamung und/oder Umkehrung von durch

physiologische oder physikalische Noxen induzierten Alterungsprozessen, vorzugsweise Alterungsprozessen, die beispielsweise durch Noxen, wie UV-Strahlung und andere Umwelteinflüsse, induziert werden. Dabei wird KOC (Gen oder Protein) vorzugsweise topisch über einen geeigneten Träger (z.B. als in Creme gelöste Liposomen, Lotionen, Pflaster, Verbände, Injektionen etc.) auf die Haut aufgetragen bzw. in diese verabreicht. Diese Verwendung beinhaltet auch eine kosmetische Applikation von KOC (Gen oder Protein) auf der Haut zur Beeinflussung von Altershaut/Falten.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der vorstehenden Verbindungen für die Regeneration von Hautdefekten oder zur beschleunigten Wundheilung. Dazu zählt auch die Bildung von Granulationsgewebe, z.B. nach Traumata, Verbrennungen oder im Rahmen von Ulcera cruris unterschiedlicher Genese.

Desweiteren hat sich gezeigt, daß ein Individuum mittels KOC gegen mit der Expression von KOC assoziierten malignen Tumoren und ihre Vorstufen immunisiert werden kann.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Verbindungen (KOC-DNA-Sequenzen/KOC-Protein) zur Immunisierung eines Individuums, z.B. eines Tieres oder eines Menschen, gegen mit der Expression von KOC assoziierten malignen Tumoren und ihre Vorstufen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein hierfür geeignetes Arzneimittel, das diese Verbindungen in einer für die Immunisierung eines Individuums geeigneten Menge enthält. Das KOC-Protein kann in Wildtyp- oder veränderter Form vorliegen. Letztere Form umfaßt Veränderungen der Aminosäuresequenz, wie Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einer oder mehreren Aminosäuren. Auch können Fragmente der KOC-Proteine als solche oder in Verbindung mit Trägern vorliegen, wobei die Fragmente eine Wildtyp- oder eine veränderte Aminosäuresequenz haben

können. Günstig ist es, wenn die Träger im Individuum nicht als immunogen wirken. Solche Träger können Individuum-eigene oder -fremde Proteine bzw. Fragmente davon sein. Bevorzugt sind Träger, wie Serumalbumin, Fibrinogen oder Transferrin bzw. ein Fragment davon. Besonders günstig ist es, wenn die Fragmente der KOC-Proteine Epitope enthalten, die von cytotoxischen T-Zellen, z.B. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, erkannt werden und eine cytotoxische Immunantwort induzieren können. Solche Epitope der KOC-Proteine können durch dem Fachmann bekannte Verfahren, insbesondere durch Verwendung eines Softwaresystems des NIH (NIH bioinformation service [http://bimas.dcrf.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken\\_parker\\_comboform](http://bimas.dcrf.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)) ermittelt werden. Von Vorteil kann es ferner sein, wenn verschiedene der KOC-Proteine oder Fragmente davon, für die die vorstehenden Ausführungen entsprechend gelten, gleichzeitig vorliegen. Zur Herstellung der KOC-Proteine bzw. ihrer Fragmente wird ergänzend zu den vorstehenden Ausführungen auf Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989) verwiesen.

Wird eine KOC-DNA-Sequenz zur Immunisierung eines Individuums verwendet, muß sie in einer exprimierbaren Form vorliegen, d.h. sie kann als solche zusammen mit für ihre Expression geeigneten Elementen oder in Verbindung mit einem Vektor vorliegen. Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Der Ausdruck "maligne Tumoren und ihre Vorstufen" umfaßt maligne Tumoren jeglicher Art und Herkunft, die mit der Expression von KOC assoziiert sind, und ihre Vorstufen. Beispielsweise können es Karzinome epithelialen Ursprungs, insbesondere Pankreas-, Colon-, Mamma-, Bronchial- und Anogenitalkarzinome sein.

Der Ausdruck "für eine Immunisierung eines Individuums geeignete Menge" umfaßt jegliche Menge des KOC-Proteins, für das vorstehende Ausführungen entsprechend gelten, bzw. einer exprimierbaren KOC-DNA-Sequenz, für die

vorstehende Ausführungen entsprechend gelten, mit der ein Individuum immunisiert werden kann. Die Menge hängt davon ab, ob das KOC-Protein oder die exprimierbare KOC-DNA-Sequenz verwendet wird. Auch hängt die Menge davon ab, ob die Immunisierung des Individuums mehr auf eine Induktion von gegen das KOC-Protein gerichteten Antikörpern oder auf eine Stimulierung von gegen das KOC-Protein gerichteten cytotoxischen T-Zellen, z.B. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, abzielt. Beide Möglichkeiten der Immunisierung können durch die vorliegende Erfindung erreicht werden. Desweiteren hängt die Menge davon ab, ob die Immunisierung als prophylaktische oder therapeutische Behandlung beabsichtigt ist. Darüber hinaus spricht das Alter, das Geschlecht und das Gewicht des Individuums eine Rolle für die Bestimmung der Menge. Günstig ist es, wenn dem Individuum 100µg - 1 g des KOC-Proteins bzw.  $10^6$  -  $10^{12}$  MOI eines rekombinanten, eine exprimierbare KOC-DNA-Sequenz enthaltenden Virus injiziert werden. Die Injektion kann an mehreren Stellen des Individuums intramuskulär, subkutan, intradermal oder in jeder anderen Applikationsform erfolgen. Ferner kann es günstig sein, ein oder mehrere "Booster-Injektionen" mit ca. gleicher Menge durchzuführen, wobei es besonders günstig sein kann, in den einzelnen Injektionen verschiedene Fragmente des KOC-Proteins zu verwenden. Desweiteren ist es günstig, wenn zur Immunisierung des Individuums das Arzneimittel Immunisierungs-Adjuvantien, wie GM-CSF oder Freund's Adjuvans, enthält.

Desweiteren kann ein nicht-menschliches Säugetier ("knock-out") durch übliche Verfahren bereitgestellt werden, dessen KOC-Gen verändert ist. Günstig ist ein Verfahren, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Herstellung eines DNA-Fragments, insbesondere eines Vektors, enthaltend ein verändertes KOC-Gen, wobei das Gen durch Insertion einer heterologen Sequenz, insbesondere eines selektierbaren Markers, verändert worden ist;
- (b) Präparation embryonaler Stammzellen aus einem nicht-menschlichen Säuger (bevorzugt Maus);

- (c) Transformation der embryonalen Stammzellen von Schritt (b) mit dem DNA-Fragment von Schritt (a), wobei das KOC-Gen in den embryonalen Stammzellen durch homologe Rekombination mit dem DNA-Fragment von (a) verändert wird,
- (d) Kultivieren der Zellen von Schritt (c),
- (e) Selektion der kultivierten Zellen von Schritt (d) auf das Vorhandensein der heterologen Sequenz, insbesondere des selektierbaren Markers,
- (f) Erzeugen chimärer nicht-menschlicher Säuger aus den Zellen von Schritt (e) durch Injektion dieser Zellen in Säuger-Blastozysten (bevorzugt Maus-Blastozysten), Übertragen der Blastozysten in pseudo-schwangere weibliche Säuger (bevorzugt Maus) und Analyse der erhaltenen Nachkommen auf eine Veränderung des KOC-Gens.

In Schritt (c) wird der Mechanismus der homologen Rekombination (vgl. R.M. Torres, R. Kühn, Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting, Oxford University Press, 1997) ausgenutzt, um embryonale Stammzellen zu transfizieren. Die homologe Rekombination zwischen den in einem Chromosom vorhandenen DNA-Sequenzen und neuen, hinzugefügten klonierten DNA-Sequenzen ermöglicht das Einfügen eines klonierten Gens in das Genom einer lebenden Zelle anstelle des ursprünglichen Gens. Mit dieser Methode können bei Verwendung embryonaler Keimzellen via Chimären Tiere erhalten werden, die für das gewünschte Gen oder den gewünschten Genteil oder die gewünschte Mutation homozygot sind.

Der Ausdruck "embryonale Stammzellen" betrifft jegliche embryonalen Stammzellen eines nicht-menschlichen Säugetiers, die sich zur Mutierung des KOC-Gens eignen. Vorzugsweise sind die embryonalen Stammzellen von der Maus, insbesondere die Zellen E14/1 oder 129/SV.

Der Ausdruck "Vektor" umfaßt jeglichen Vektor, der durch Rekombination mit der DNA von embryonalen Stammzellen eine Veränderung des KOC-Gens er-

möglichst. Vorzugsweise weist der Vektor einen Marker auf, mit dem auf vorhandene Stammzellen selektioniert werden kann, in denen die gewünschte Rekombination erfolgt ist. Ein solcher Marker ist z.B. die loxP/tk neo-Cassette, die mit Hilfe des Cre/loxP-Systems wieder aus dem Genom entfernt werden kann.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen und Materialien, um die Schritte (a)-(f) durchzuführen.

Mit der vorliegenden Erfindung wird ein nicht-menschliches Säugetier bereitgestellt, dessen KOC-Gen verändert ist. Diese Veränderung kann ein Ausschalten der Funktion sein. Mit einem solchen Säugetier bzw. Zellen daraus kann selektiv die Funktion des KOC-Proteins untersucht werden. Ferner ist es hiermit möglich, Substanzen, Arzneimittel und Therapieansätze zu finden, mit denen selektiv auf die Funktion eingewirkt werden kann. Daher liefert die vorliegende Erfindung eine Basis, um auf die verschiedensten Erkrankungen einzuwirken. Solche Erkrankungen sind z.B. die Induktion von Krebs durch Fehler bei der Kontrolle der Zellproliferation. Ferner ermöglicht das Säugetier mit veränderter KOC-Funktion Untersuchungen, ob man durch Applikation von diversen Cancerogenen eine abgeschwächte, wenn nicht sogar keine Tumorentwicklung in diesen Tieren beobachtet. Das Tier stellt ein neues Krankheitsmodell für die Entwicklung neuer Therapieansätze dar.

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch die Verwendung der in Figur 9 gezeigten DNA-Sequenz des KOC-Promotors oder der davon abweichenden Nucleinsäuresequenz, deren biologische Funktion im wesentlichen der des KOC-Promotors entspricht zur Isolierung und/oder Anreicherung und/oder selektiven Vermehrung von Stammzellen, vorzugsweise nicht-menschlichen embryonalen Stammzellen.

Stammzellen sind die Urzellen, aus denen sich die einzelnen Gewebe eines Organismus entwickeln. Weil alle Zelltypen eines Organismus aus nur einer



einzigsten Ausgangszelle, der Zygote (befruchtete Eizelle), entstehen, haben alle Stammzellen Vorläufer, die je nach Entwicklungsstadium des Individuums unterschiedliche Fähigkeiten (Potenzen) zur Bildung neuer Gewebe haben. So spricht man von toti-, pluri- und multipotenten Stammzellen. Die am frühesten auftretenden Stammzellen, die embryonalen Stammzellen, sind totipotent. Aus ihnen können jegliche Gewebe entstehen. Spätere Stammzellen verlieren diese Fähigkeit und sind dann nur noch in der Lage, einzelne Gewebe zu generieren. Werden Stammzellen für wissenschaftliche oder medizinische Zwecke benötigt, so muß bei der Stammzellgewinnung eine sorgfältige Trennung von anderen differenzierten Zellen gewährleistet sein, da diese unter Kulturbedingungen die embryonalen Stammzellen überwachsen können. Weiterhin wird durch eine kontinuierliche Präsenz bestimmter differenzierter Zellen die Differenzierung oder der programmierte Zelltod von Stammzellen induziert. Aus diesem Grund ist es wünschenswert, eine Selektion von Stammzellen, z.B. embryonalen Stammzellen aus der "Mischkultur" vornehmen zu können. Durch eine genetische Manipulation ist es möglich, genetische Selektionsmarker in die Zellen einzubringen, deren Genprodukte unter bestimmten Kulturbedingungen ein selektives Überleben der Stammzellen gewährleisten. So kann ein Genprodukt beispielsweise eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika hervorrufen. Alle Zellen, die dieses Resistenzgen nicht exprimieren, können durch Zusatz des jeweiligen Antibiotikums im Kulturmedium eliminiert werden. Eine entscheidende Voraussetzung für eine Selektion von Stammzellen ist, daß der jeweilige Selektionsmarker unter der Kontrolle eines Promoters steht, der ausschließlich in den Stammzellen aktiviert wird. Da der KOC-Promoter nur in dieser Zeit aktiviert wird, kann dieser als Steuereinheit für die Selektion von Stammzellen herangezogen werden. Dazu wird durch Infektion/Transfektion eines Vektors, bei dem ein Selektionsmarker unter der Kontrolle des KOC-Promoters steht, den Stammzellen ein Selektionsvorteil unter konditionierten Kulturbedingungen (z.B. Addition von Antibiotika) gegenüber Zellen, die sich nicht mehr im embryonalen Zustand befinden bzw. schon differenziert sind, ein Selektionsvorteil verschafft. Verfahren zur Infektion/Transfektion von

Stammzellen, geeignete Vektoren und geeignete Selektionsmarker, z.B. das System neo-Gen/G418, sind dem Fachmann bekannt; siehe dazu auch die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich der Beschreibung des nicht-menschlichen Säugetiers. Der Fachmann kennt auch geeignete Züchtungsverfahren und Medien, um Stammzellen, z.B. embryonale Stammzellen, kultivieren zu können; siehe z.B. DE 196 08 813 C2, EP-B1 0 695 351. Das "Grundmedium", das z.B. das Antibiotikum in geeigneter Konzentration zur Selektion enthält, kann jedes Medium sein, das üblicherweise für die Züchtung von Säugerzellen verwendet wird. Die Zellen werden in dem vorstehenden Medium unter geeigneten Bedingungen, gegebenenfalls unter (teilweiser) Erneuerung des Mediums in geeigneten Zeitabständen, gezüchtet. Geeignete Bedingungen, beispielsweise hinsichtlich geeigneter Behälter, Temperatur, relativer Luftfeuchte, O<sub>2</sub>-Gehalt und CO<sub>2</sub>-Gehalt der Gasphase sind dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise werden die Zellen in dem Medium unter den folgenden Bedingungen kultiviert: (a) 37°C, (b) 100% rel. Luftfeuchte, (c) 10% O<sub>2</sub> und (d) 5% CO<sub>2</sub>. Der Fachmann kann auch die gewünschte Hemmung der Differenzierung der Zellen anhand üblicher Kriterien (morphologische Kriterien, Anwesenheit bzw. Abwesenheit spezifischer Oberflächenproteine etc.) überwachen.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Verwendung der in Figur 9 gezeigten DNA-Sequenz des KOC-Promotors oder der davon abweichenden Nucleinsäuresequenz, deren biologische Funktion im wesentlichen der des KOC-Promotors entspricht, zur Ermittlung des Differenzierungsgrads oder Dedifferenzierungsgrads einer Zelle oder eines Gewebes. Hierzu ist es günstig, die DNA-Sequenz von Figur 9 oder die davon abweichende Nucleinsäuresequenz mit einem Reporter-Gen zu verbinden und das Konstrukt in die Zelle oder das Gewebe einzuführen sowie die Expression des Reporter-Gens nachzuweisen, was Auskunft über den Differenzierungsgrad bzw. Dedifferenzierungsgrad gibt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein diagnostischer Kit zu Durchführung des vorstehend beschriebenen Diagnoseverfahrens, der eine zur spezifischen Hybridisierung mit einer DNA-Sequenz des KOC-Promotors geeignete Sonde oder einen Primer enthält. Bezüglich der Ausgestaltung des Kits gelten die vorstehend gemachten Ausführungen hinsichtlich des das KOC-Protein oder KOC-Gen betreffenden diagnostischen Kits sinngemäß. Von den Erfindern wurden Primerpaare charakterisiert, die sich für die oben genannten Zwecke, z.B. als Tumorindikator, bestens eignen. Diese können im Rahmen des Kits bereitgestellt werden. Die bevorzugten Primer sind:

Forward Primer:

ATG 14	5'-ATATCGGAAACCTCAGCGAG-3'
ATG 651	5'-CATTCTGGGAACATCACCAAAC-3'
ATG 778	5'-GGGGTATTAAACGTGCATTT-3'
ATG 1428	5'-CACTGTCATGAGCCTCACTA-3'

Reverse Primer:

ATG 98	5'-GTAGCCAGTCTTCACCAGGA-3'
ATG 341	5'-TGCAGTTTCCGAGTCAGTGT-3'
ATG 757	5'-GACTTACAAGCCGCAGAGGT-3'
ATG -217	5'-TGACAGAATTTAAACCAGCA-3'

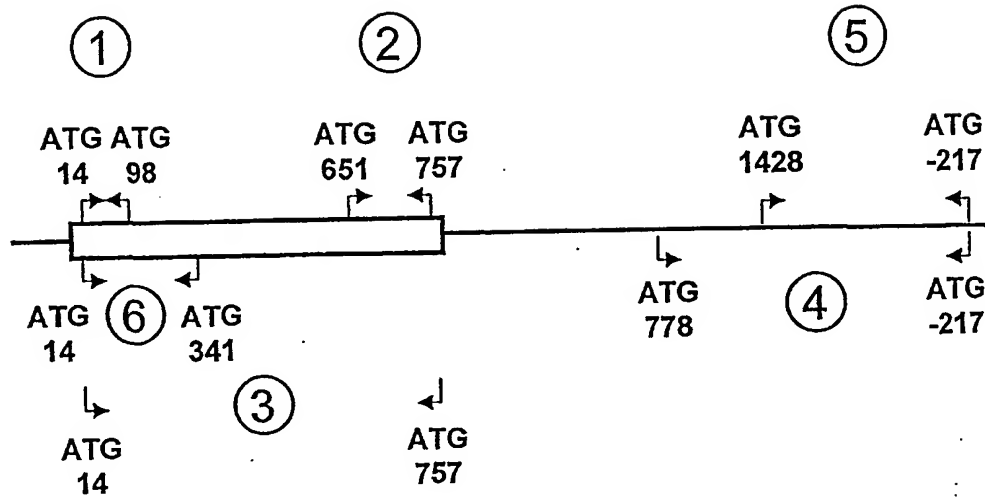
Ganz besonders bevorzugt sind die folgenden Primerpaar-Kombinationen:

ATG 14 - ATG 98 (1)

ATG 651 - ATG 757 (2)

ATG 14 - ATG 341 (6)

14. Februar 2001



Bei den bislang in der Klinik verwendeten konventionellen Tumormarkern handelt es sich in der Regel um Akutphaseproteine, die zwar im Verlauf einer Tumorerkrankung in ihrem meßbaren Wert ansteigen, jedoch auch bei zahlreichen pathophysiologischen Zuständen, z.B. Niereninsuffizienz, Entzündungen, etc., über den Normalwert im Serum erhöht zu finden sind. Diese Tumormarker haben ihre klinische Bedeutung erst dann, wenn sie erstens deutlich erhöht vorliegen und zweitens im Verlauf einer Erkrankung oder Therapie sich in ihrem Wert verändern. Das heißt, die meisten gängigen Tumormarker eignen sich höchstens zur Verlaufsbeurteilung oder Therapieevaluation. Sie haben jedoch primär keinen diagnostischen Aussagewert. Durch Verwendung von KOC als Tumorindikator wird es erstmals möglich, aus Zufallsbefunden, z.B. bei bildgebenden Verfahren, mit exzellenter Spezifität und Sensitivität vorauszusagen, ob es sich bei einer Läsion um eine maligne oder benigne Raumforderung handelt. Dies ist insbesondere von Interesse, da KOC diese Information bzgl. jeglicher Gewebe leistet und somit ein universell einsetzbarer Tumorindikator zur Diagnosesicherung von

Raumforderungen ist. Bemerkenswert ist ferner, daß KOC durch andere pathophysiologische Zustände, wie z.B. Entzündungen, in seinem Expressionsverhalten nicht beeinflusst wird und damit eine 100%ige Sensitivität und Spezifität gewährleistet. Die Bedeutung von KOC als Tumorindikator ergibt sich auch aus der Tatsache, daß untersucherabhängige Einflüsse absolut auszuschließen sind. Somit kann KOC als Surrogatparameter die zytologische Diagnosesicherheit erheblich verbessern. Ergänzend wird auf vorstehende Ausführungen hinsichtlich der Verwendung von KOC als Tumorindikator verwiesen.

Seit langem ist außerdem bekannt, daß bestimmte Chemotherapeutika beim Menschen anfänglich gut, aber nach einiger Zeit zunehmend weniger wirksam sind. Ursache dieser "Resistenz" ist ein Mechanismus, den Tumorzellen selbst in Gang bringen, da Chemotherapeutika das sogenannte Multi-Drug-Resistenz (mdr-1)-Gen aktivieren können. Das Genprodukt selber befindet sich auf der Zellmembran und ist für einen Transport fremder Substanzen aus der Zelle verantwortlich. Auf diese Weise werden die Medikamente unwirksam. Diese Resistenz kann z.B. über den Tumor-Nekrose Faktor (TNF-alpha) verhindert werden. Von außen zugeführt oder auch als Gen transferiert, hemmt TNF-alpha die Expression des MDR1-Gens und damit die Resistenzentwicklung. Verpackt man beispielsweise das TNF-alpha-Gen mit der Promotor-Sequenz des mdr-1-Gens in einen Vektor und behandelt ein Tier mit diesem Vektor-Konstrukt und mit Chemotherapeutika, die auf die Promotersequenzen des mdr-1-Gens einwirken, so schaltet sich die Produktion von TNF alpha an, verhindert die Resistenzbildung und fördert den Untergang der Tumorzelle durch Apoptose. Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, daß eine für den Patienten belastende Chemotherapie zusätzlich erfolgen muß. Ein weiteres Beispiel ist die Therapie mit Cisplatin (cis-diaminedichloroplatinum), welches als aktives Agens bei einer Vielzahl von malignen Erkrankungen als Chemotherapeutikum Verwendung findet. Da der KOC-Promoter während der malignen Transformation einer Zelle aktiviert wird (siehe das nachstehende

Beispiel 6), eignet sich dieser ausgezeichnet als Kontrolleinheit für eine sog. "gene-directed enzyme pro drug (suicide gene) therapy" (GDEPT) zur Behandlung einer Vielzahl maligner Erkrankungen. Vorzugsweise ist für diese gentherapeutische Krebsbehandlung das HSV-TK-Gen (in Kombination mit der Applikation von Ganciclovir, das durch Phosphorylierung über die HSV-TK toxisch wird), ein Tumorsuppressor-Gen, z.B. p53, p16, p21, DPC4, APC, etc., oder ein Apoptose induzierendes Gen, z.B. bad, Caspasen, etc., mit dem KOC-Promoter funktionell verknüpft.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der in Figur 9 gezeigten DNA-Sequenz des KOC-Promotors oder der davon abweichenden Nucleinsäuresequenz, deren biologische Funktion im wesentlichen der des KOC-Promotors entspricht, zur gentherapeutischen Krebsbehandlung. Bezüglich der Durchführung einer Gentherapie bzw. den dafür geeigneten Vektoren gelten die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich der KOC-DNA-Sequenzen sinngemäß.

Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die an die DNA-Sequenz des erfindungsgemäßen KOC-Promotors binden und dessen Aktivität modulieren, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- a) Inkontaktbringen einer DNA-Sequenz des erfindungsgemäßen KOC-Promotors mit einer Testverbindung in einem zellulären Assay; und
- b) Bestimmung der Modulierung der Aktivität des KOC-Promotors, wobei eine Modulierung anzeigt, daß die Testverbindung wirksam ist.

Bei den Testverbindungen kann es sich um sehr unterschiedliche Verbindungen handeln, sowohl natürlich vorkommende als auch synthetische, organische und anorganische Verbindungen, sowie Polymere, z.B. Oligopeptide, Polypeptide, Oligonucleotide und Polynucleotide, ferner kleine Moleküle, Antikörper, Zucker, Fettsäuren, Nucleotide und Nucleotid-Analoga, Analoga von natürlich

vorkommenden Strukturen, z.B. Peptid-"Imitatoren", Nucleinsäureanalogue etc., und zahlreiche weitere Verbindungen. Besonders geeignet sind als Testverbindungen Transkriptionsfaktoren.

Bei der Durchführung des zellulären Assays muß gewährleistet sein, daß die Testverbindung mit der DNA-Sequenz des KOC-Promotors, der die Transkription eines Reportergens steuert, unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht wird, daß eine spezifische Bindung ermöglicht wird. Danach wird vorzugsweise im selben Testsystem bestimmt, ob eine Modulation der Transkription des mit dem Reportergen funktionell verknüpften Promotors durch Anwesenheit der Testverbindung stattgefunden hat. Beispiele für geeignete Reportergene sind GFP, Lacz, Luziferase oder CAT. Dabei werden die gefundenen Werte hinsichtlich der Transkriptionsrate vorzugsweise mit den Werten in einem zweiten Testsystem verglichen, daß sich von dem ersten nur durch die Abwesenheit der Testverbindung unterscheidet. Grundsätzlich geeignete Assay-Formate für die Identifizierung von Verbindungen, die die Modulation der Aktivität des KOC-Promotors beeinflussen, sind in der biotechnologischen und pharmazeutischen Industrie gut bekannt und für den Fachmann sind zusätzliche Assays und Variationen des vorstehend zur Veranschaulichung bereitgestellten Assays offensichtlich.

Veränderungen hinsichtlich der Promotoraktivität können durch jedes geeignete Verfahren gemessen werden. Änderungen im Expressionsspiegel können unter Verwendung von dem Fachmann gut bekannten Verfahren untersucht werden. Dazu zählt die Überwachung der mRNA-Konzentration, z.B. unter Verwendung geeigneter Sonden oder Primer, Immunoassays hinsichtlich der Proteinkonzentration, RNase-Schutzassays, Amplifikationsassays oder jedes andere für einen Nachweis geeignete Mittel, das auf dem Fachgebiet bekannt ist. Weitere Nachweisverfahren hinsichtlich der Aktivierung des Promotors richten sich nach den spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Reportergens.

Das Suchen nach Verbindungen, die für eine Modulation der Aktivität des KOC-Promotors wirksam sind, kann auch in großem Maßstab erfolgen, beispielsweise dadurch, daß eine sehr hohe Anzahl von Kandidaten-Verbindungen in Substanzbibliotheken gescreent wird, wobei die Substanzbibliotheken synthetische oder natürliche Moleküle, z.B. cDNAs aus Expressionsbibliotheken, enthalten können. Somit ist in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die Testverbindung Bestandteil einer Substanzbibliothek.

Das vorstehende erfindungsgemäße Verfahren kann anhand von Protokollen modifiziert werden, die in der wissenschaftlichen Literatur und der Patentliteratur beschrieben und auf dem Fachgebiet bekannt sind. Beispielsweise kann eine große Anzahl von möglicherweise nützlichen Molekülen in einem einzigen Test gescreent werden. Beispielsweise können dann, wenn ein Feld von 1000 Verbindungen gescreent werden soll, im Prinzip alle 1000 Verbindungen in eine Mikrotiterplattenvertiefung gegeben und gleichzeitig getestet werden. Wenn ein Promotor-Modulator entdeckt wird, kann dann der Pool von 1000 in 10 Pools von 100 aufgeteilt werden und der Prozeß solange wiederholt werden, bis ein individueller Modulator identifiziert ist. Jedenfalls können die Herstellung und das simultane Screenen von großen Banken aus synthetischen Molekülen mittels gut bekannter Verfahren der kombinatorischen Chemie ausgeführt werden, siehe beispielsweise van Breemen, Anal. Chem. 69 (1997), 2159-2164 und Lam, Anticancer Drug Des. 12 (1997), 145-167.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch als Screening mit hohem Durchsatz ("high throughput screening") stark beschleunigt werden. Die hier beschriebenen Assays hinsichtlich der Promotor-Modulation können zur Verwendung in einem solchen Verfahren entsprechend modifiziert werden. Es ist für den Fachmann offensichtlich, daß für diesen Zweck zahlreiche Verfahren zur Verfügung stehen.



Darüber hinaus kann eine große Anzahl von möglicherweise nützlichen Promotoraktivität-modifizierenden Verbindungen in Extrakten von natürlichen Produkten als Ausgangsmaterial gescreent werden. Solche Extrakte können aus einer großen Anzahl von Quellen stammen, beispielsweise den Spezies Pilze, Actinomyceten, Algen, Insekten, Protozoen, Pflanzen und Bakterien. Die Extrakte, die Modulation zeigen, können dann zur Isolierung des aktiven Moleküls analysiert werden. Siehe beispielsweise Turner, J. Ethnopharmacol. 51 (1-3) (1996), 39-43 und Suh, Anticancer Res. 15 (1995) 233-239. Die gefundenen die Aktivität des KOC-Promotors modulierenden Verbindungen können vielfach therapeutisch, z.B. im Rahmen einer Tumorthherapie, eingesetzt werden.

#### **Kurze Beschreibung der Figuren:**

Figur 1: DNA-Sequenz des für das RNA-bindende Protein KOC kodierenden Gens und davon abgeleitete Aminosäuresequenz

Figur 2: Proliferation von Zellen, die KOC und p210 exprimieren und Zellen, die nur p210 exprimieren

Zellen, die KOC und p210 exprimieren, proliferieren im Vergleich zu Zellen, die nur p210 exprimieren, 10-fach mehr.

Figur 3: Wachstum von Zellen, die KOC und p210 exprimieren und Zellen, die nur p210 exprimieren

Zellen, die KOC und p210 exprimieren, wachsen im Vergleich zu Zellen, die nur p210 exprimieren, stromaunabhängig

Figur 4: Resistenz von Zellen, die KOC und p210 exprimieren und Zellen, die nur p210 exprimieren, gegenüber Dexamethason

Zellen, die KOC und p210 exprimieren, sind im Vergleich zu Zellen, die nur

p210 exprimieren, resistent gegenüber Dexamethason

Fig. 5: Überexpression des Embryonalmarkers IGF-II in transgenen Mäusen

Fig. 6: Anwendung von KOC als molekularbiologischer Tumorindikator

Fig. 7: Nachweis der embryonalspezifischen Aktivierung des KOC-Promotors über Northern-Blot-Analysen

Northern-Blot-Analyse der KOC Expression in der Entwicklung muriner Embryonen. Jede Spur enthält 2 µg poly(A)<sup>+</sup> RNA von Mäuseembryonen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Tag 7-17 postcoitum). (Fig. 7a)

KOC Expression während der humanen embryonalen Pankreasentwicklung. Jede Spur enthält 2µg poly(A)<sup>+</sup> RNA von humanem embryonalen Pankreas zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Hybridisierungssignale erscheinen als Schmier durch die leichte Degradation der mRNA. (Fig. 7b)

Fig. 8: Ergebnisse der RT-PCR von verschiedenen Geweben

Ergebnis einer RT-PCR Analyse mit dem Primerpaar 6. Verwendet wurde die Gesamt-RNA von sechs unterschiedlichen humanen gesunden Pankreasgeweben, sechs unterschiedlichen chronischen Pankreatitisgeweben, zwei gesunden Colongeweben, einem Colonkarzinomgewebe (1), einem Weichteilsarkomgewebe (2), einem Magenkarzinomgewebe (3) und elf Pankreaskarzinomgeweben.

Fig. 9: DNA-Sequenz des KOC-Promotors

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

### **Beispiel 1: Die Überexpression von KOC führt in adulten pre-B-Zellen zu Apoptose-Resistenz**

Ein gut untersuchtes Modellsystem, um Entwicklungsprozesse zu studieren, sind murine pre B-Zellen. Murine pre B-Zellen wurden entweder aus adultem Knochenmark oder fötaler Leber isoliert. Zur Isolation des adulten Knochenmarks wurden die Tibiae und Femura von Mäusen isoliert. Anschließend wurden sie mit Medium (DMEM, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland), ausgespritzt. Zur Isolation der fötalen Vorläuferzellen wurde jeweils die Leber von Tag 15 Mäuse-Embryonen isoliert. Diese wurde anschließend jeweils durch ein steriles Zellkultursieb zerrieben, wobei die einzelnen Blutvorläuferzellen freigesetzt werden. Von adultem Knochenmark und fötaler Leber wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen pro 6 cm kultiviert. Sowohl die adulten Zellen als auch die fötalen Zellen konnten vergleichsweise einfach in vitro kultiviert werden und somit auf Unterschiede in der Genexpression und auf funktionelle Unterschiede hin analysiert werden. Für beide Zellpopulationen standen verschiedene in vitro Kultursysteme zur Verfügung.

Ein System bestand darin, die Zellen auf einer Stromazelllinie in Gegenwart des Wachstumsfaktors Interleukin 7 (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) zu kultivieren. Vorliegend wurde die Stromazelllinie ST2 verwendet. Die Zellen wurden expandiert bis sie zu etwa 80% konfluent waren. Anschließend wurden sie mit 3000 rad bestrahlt. Auf diese Weise behandelte Zellen waren wachstumsinaktiv, besaßen jedoch noch für einige Tage einen Stoffwechsel. Knochenmark oder fötale Leberzellen wurden auf dieser Zelllinie mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen mit einer Konzentration von 10ng IL7 pro ml plattiert. Unter diesen Bedingungen wuchsen ausschließlich pre-B Zellen. Die Zellen wurden 2x pro Woche auf frische Stromazellen ausplattiert.

In einem zweiten System wurden das Knochenmark oder die fötalen Leberzellen mit dem vergleichsweise gering tumorigenen Onkogen p210 BCR-ABL

transformiert. Dieses ist ein Fusionsprotein, das durch eine chromosomale Translokation entstanden ist, wobei Teile des BCR (break point cluster region) Gens von Chromosom 22 fusioniert mit c-ABL (Tyrosinkinase) auf Chromosom 9 (Philadelphia Chromosom) vorliegen, wodurch die Kinase c-ABL aktiviert wird. Die angesprochene Translokation ist mit chronischer myeloischer Leukämie vergesellschaftet. Es wurde eine retrovirale Infektion durchgeführt. Hierzu wurde p210 BCR-ABL in den retroviralen Vektor pBMNZ (erhältlich von Garry Nolan, Stanford; Vektormappe: <http://www.stanford.edu/group/nolan/pmaps.htm>) kloniert. Jeweils  $10^7$  Zellen wurden mit 3ml retroviralem Überstand in Gegenwart von 8 mg/ml Polybrene in 50ml konischen Tubes für mindestens 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden mit IL7 auf Stroma plattiert. Nach 48 Stunden wurde IL7 ausgewaschen und die Zellen wurden ohne IL7 plattiert. Da BCR-ABL die pre-B Zellen IL7 unabhängig machte, wuchsen nur Zellen aus, die mit dem für BCR-ABL kodierenden Retrovirus infiziert worden waren (Fig. 3). Eine Selektion für z.B. G418 konnte daher unterbleiben. Wie erwähnt, waren die BCR-ABL transformierten Zellen zunächst IL7 unabhängig und später auch Stroma-unabhängig. Die derart transformierten Zellen waren jedoch noch in der Lage, in vivo zu reifen B-Zellen zu differenzieren.

Bisher war bekannt, daß sich adulte pre B-Zellen von fötalen durch die Expression zweier Gene unterscheiden: Die terminale Desoxynukleotidtransferase (TdT) und die "myosin light chain 2" (PLRLC) werden in adulten pre B-Zellen exprimiert, nicht aber in fötalen. Bekannte funktionelle Unterschiede bestehen darin, daß fötale pre B-Zellen resistent gegen Steroide sind, während adulte Zellen nach Steroidapplikation apoptotisch werden. Weiterhin können fötale pre B-Zellen in vitro zeitlich unbegrenzt in Kultur gehalten werden, während die adulten Zellen nach einigen Monaten Passage sterben. Wir konnten zeigen, daß KOC in fötalen pre B-Zellen nicht jedoch in adulten exprimiert wird. Damit steht mit KOC ein Marker zur Verfügung, um fötale pre B-Zellen von adulten zu diskriminieren.

Um die funktionellen Konsequenzen der KOC Expression zu studieren, wurden adulte pre B-Zellen, die mit p210 BCR-ABL transformiert worden waren, mit einem Retrovirus infiziert (pBMZ), das für KOC kodierte. Die Infektion wurde analog durchgeführt, wie oben für das BCR-ABL kodierende Retrovirus beschrieben. Auf diese Weise gelang eine KOC-Überexpression in den adulten pre B-Zellen. Im Vergleich zu nicht-KOC exprimierenden Zellen waren die exprimierenden Zellen deutlich resistenter gegen Apoptose, die durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst wurde. Am eindrucksvollsten war dabei die Resistenz gegenüber Steroiden. Während die KOC exprimierenden Zellen bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M Dexamethason ungehemmt proliferierten, starben sämtliche Kontrollzellen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß im Tymidin-einbau-Assay die DNA-Synthese der KOC/p210 Zellen im Vergleich zu den p210 Zellen deutlich stärker ist (Fig. 4).

**Beispiel 2: Durch die Überexpression von KOC wird die fötale Genexpression reinduziert**

Nachdem die in Beispiel 1 beschriebenen deutlichen phänotypischen Unterschiede der beiden Zellpopulationen beobachtet werden konnten, erschien es sinnvoll, ein Genexpressionsprofil dieser Zellen unter Verwendung des "Gene-Chip"-Systems von Affymetrix zu erstellen. Dabei handelt es sich um einen Oligonukleotid-Array, der mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierter RNA der jeweiligen Zellpopulation hybridisiert wird. Die Spezifität der Hybridisierung wird durch das Vorhandensein von 20 Nukleotidsonden pro Gen mit vollkommener Sequenzübereinstimmung und 20 Nukleotidsonden mit einer Basenfehlpaarung sichergestellt. Unter Verwendung dieser Methode konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die differenziell exprimiert werden. So waren beispielsweise Cyclin D1 und IGF-II nur in den Zellen nachweisbar, die neben p210 auch KOC exprimierten. In dem hier beschriebenen Zusammenhang ist besonders erwähnenswert, daß in den KOC exprimierenden Zellen die Markergene für den

adulten preB-Zell-Phänotyp TdT und PLRLC vollständig herabreguliert waren. Da, wie oben beschrieben, diese beiden Marker die einzig beschriebenen sind, die adulte preB-Zellen von fötalen unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, daß durch die Überexpression von KOC eine fötale Genexpression reinduziert wird. Dabei ist noch besonders hervorzuheben, dass erstens der Grad der differentiellen Veränderung im Pankreas transgener Mäuse eindeutig von der Expressionsstärke von KOC abhängt und zweitens die embryonalen Marker infizierter preB-Zellen analog zur KOC-Expression hochreguliert werden. Durch diese Tatsache wird es möglich, durch eine Gabe unterschiedlicher KOC Mengen entsprechende Dosiseffekte in den jeweiligen Organen zu erreichen.

Als Ergebnis der vorstehenden Experimente wird nachfolgend eine Auswahl von Genen angegeben, die durch KOC in den BCR-ABL exprimierenden Zellen differentiell exprimiert werden:

## HOCHREGULIERT:

### Oncogenes and Tumor Suppressors

SKY proto-oncogene, tyro3 precursor; rse; dtk; TK19-2  
breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2)  
Fli-1 ets-related proto-oncogene

### Cell Cycle Regulator

cyclin D1 (G1/S-specific)  
Cdk7; MO15; cyclin-dependent kinase 7

### Transcription Factors & DNA-binding Proteins

DNA-binding protein SATB1  
activating transcription factor 4 (mATF4)  
ikaros DNA binding protein  
brain factor 1 (Hfhbf1)

### Growth Factors & Cytokines

insulin-like growth factor-2 (somatomedin A)  
tumor necrosis factor beta (TNF-beta); lymphotoxin-alpha  
bone morphogenetic protein 1 precursor (BMP1)  
bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)  
basic fibroblast growth factor (b-FGF)

## HERUNTERREGULIERT:

transferrin receptor protein (p90; CD71)  
RAG-1; V(D)J recombination activating protein  
interleukin-7 receptor alpha (IL-7 receptor alpha)  
dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; DPP4)

PLRLC myosin light chain 2  
terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)  
transforming growth factor beta-3 (TGF-beta 3)

### Beispiel 3: Transgenes Mausmodell

Um die in vitro gezeigte Redifferenzierung hämatopoetischer Zellen auch in vivo an anderen Zelltypen zu bestätigen (z.B. an epithelialen Zellen) wurde die Auswirkung einer Überexpression von KOC in einem transgenen Mausmodell untersucht.

Für eine regelbare und ubiquitäre Überexpression wurde eine Mauslinie konstruiert, bei der die Expression von KOC unter der Kontrolle des Metallothionein-Promoters steht (Palmiter et al., Mol. Cell. Biol. 13(9) (1993), 5266-5275). Die Induktion der KOC-Transkription konnte so durch Zink-Applikation im Trinkwasser aktiviert und kontrolliert werden.

Um die transgenen Mäuse herzustellen, wurde die kodierende cDNA des humanen KOC-Gens in sense Orientierung direkt hinter den Metallothionein-Promoter des Expressionsvektors MT-LCR 2999B4 kloniert (Palmiter et al., 1993, Mol Cell Biol, 13, 5266-5275). Das DNA-Konstrukt (DraI-Fragment, das den kompletten offenen Leserahmen von KOC enthält, wurde in die NruI-Schnittstelle des MT-LCR2999B4 kloniert) wurde mit der Restriktionsendonuklease Sall (z.B. Fa. Roche, Penzberg) geschnitten. Das geschnittene Konstrukt wurde mittels einer Mikroinjektionsanlage in den weiblichen Pronukleus nach Standardprotokoll injiziert (Standardprotokoll beschrieben in: "The Molecular Biology of the Gene", James D. Watson et al., 4<sup>th</sup> Ed., Transgenic Mice: Mice with new germ line genes, S. 814 ff.). Anschließend wurden die Zellen in ein pseudoschwangeres Weibchen transferiert. Mittels PCR- und Southern Blot Analyse der genomischen DNA aus Schwanzspitzen der 1-2 Monate alten Mäuse wurden die Tiere identifiziert, die das transgene Konstrukt integriert haben. Diese Founder wurden mit B6 Mäusen gekreuzt. Durch erneute PCR-Analyse der genomischen DNA der Nachkommen dieser F1 Generation wurden die Linien ermittelt, die das Transgen vererben.



Die Isolation der genomischen DNA aus Mäuseschwänzen erfolgte mit dem "Qiagen tissue Kit" und wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt (Qiagen GmbH, Hilden).

Die PCR-Reaktionen fanden unter folgenden Bedingungen statt:

PCR-Reaktion:	Ausgangsmaterial	500ng genomische DNA
		bzw. 100ng cDNA
	Primer	je 100ng (20pmol)
	5x Mg <sup>2+</sup> freier Puffer, pH 9.5	10µl
	10mM dNTPs	5µl
	HotWax <sup>TM</sup> Kügelchen, 2.5mM MgCl	1 Stück
	Taq Polymerase (5U/µl)	0.5µl
	ddH <sub>2</sub> O	ad 50µl

PCR-Bedingungen:	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Hot Start	2 Min	95°C	1x
Denaturierung	30 Sek	95°C	35x
Annealing	30 Sek	s.u.	
Extension	2 Min	72°C	
Finale Extension	10 Min	72°C	1x

Primer: Koc2117for: 5'-GAGGACCAGGCAACTTTTG-3' (KOC-spezifisch)  
 hGH1rev: 5'-ACTGGAGTGGCAACTTCC-3'(aus Sequenzabschnitt  
 des humanen Wachstumshormons, dient zur Stabilität der mRNA)

HotWax<sup>TM</sup>, Fa. Invitrogen, Groningen, Netherlands

Histologische Untersuchungen des Pankreas der Mäuse zeigten deutliche Veränderungen der Organstruktur. Tumore wurden auch bei Tieren, die KOC sehr stark exprimieren, in einem bislang einjährigen Beobachtungszeitraum (bei einem Gesamtlebensalter der Tiere von etwa zwei Jahren) nicht beobachtet. Auch hatte die ektopische KOC-Überexpression keinen Einfluß auf das Allgemeinbefinden/Verhalten der Mäuse. Schließlich wurde immunhistologisch überprüft, welche embryonalen Marker im Pankreas transgener Mäuse hochreguliert werden. Die RT-PCR Daten zeigten, dass neben anderen Genen IGF-II, das normalerweise in Mäusen nur im Embryonalstadium exprimiert wird, auch in adulten transgenen Tieren wieder überexprimiert wird (Fig. 5).

Die Charakterisierung transgener Mäuse erfolgte im Western Blot durch Analyse verschiedener Organe zur Identifikation der transgenen Mäuse, die KOC am stärksten exprimieren. Zwei dieser Linien wurden zur Zucht weiter verwendet.

Herstellung von Western-Blots: Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Elektroblob-Verfahren (Sammy dry Schleicher & Schüll, Dassel) nach Angaben des Herstellers auf eine Nitrocellulosemembran (OPTITRAN BA-S83, Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Blots mit 5% Magermilchpulver in TBS 30Min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Anti-KOC Kaninchen-Serum erfolgte für 2Std bei RT in TBS mit 0.2%BSA und 0.01%Tween 20. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Blots mit dem zweiten, an Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (Fa. Amersham) für 1Std bei RT inkubiert. Der Nachweis erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBS unter Verwendung der ECL Western blotting detection reagents (Fa. Amersham).

**Beispiel 4: Differentialdiagnose maligner Tumoren gegenüber normalem oder entzündlichem Gewebe**

Verwendet wurden Gewebeprobe, die mittels Feinnadelpunktionen aus Geweben/Tumoren unklarer Dignität in Leber und Lymphknoten gewonnen wurden. Kontrollproben wurden aus entzündlichen Bereichen des Colon entnommen. Die Biopsate wurden in Lysispuffer (entweder Standardguanidiniumpuffer oder RLT Puffer der Fa. Qiagen, Hilden, Germany) aufgenommen und mechanisch zerkleinert.

Die Gesamt-RNA wurde mittels des "RNAeasy-Kit" der Fa. Qiagen, Hilden extrahiert. Danach erfolgte ein DNase-Verdau. Mit dem "One-Step RT-PCR Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) wurde direkt eine RT-PCR durchgeführt:

Verwendete Primer:

KOC-Primer: 5'-TGCAGTTTCCGAGTCAGTGT-3'

5'-ATATCGGAAACCTCAGCGAG-3'

Annealing Temperatur: 55°C, 35 Zyklen

5 ml des jeweiligen PCR-Ansatzes wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Das Ergebnis ist in Fig. 6 gezeigt. Dabei ist zu beachten, daß in Spur 1 keine Bande zu erkennen ist, die auf ein tumoröses Geschehen hinweisen würde, sondern wegen Überladung der Spur einen "Schmier" darstellt. Nur in den Spuren 3 und 4 sind entsprechende KOC-Banden sichtbar, sodaß hier von dem Vorliegen eines Tumors auszugehen ist.

#### **Beispiel 5: Identifizierung der DNA-Sequenz für den KOC-Promotor.**

Das KOC-Gen liegt auf Chromosom 7 in der Region 7p11.5. Insofern wurde eine Chromosom 7 spezifische genomische Bibliothek (Vektor Lawrist 4) mit einer KOC-Sonde gescreent. Die DNA positiver Klone wurde jeweils mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach Standardverfahren geblottet. Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiv markierten 5'-KOC-Sonde hybridisiert.

Ein positives 7kb großes Fragment wurde dann in den Vektor Bluescript KS (Pharmacia) kloniert. Der Klon wurde am 1. November bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) unter der Eingangsnummer DSM 13810 hinterlegt. Ferner wurde der Klon sequenziert. Die ersten 1946 bp vom ATG stromaufwärts sind in Fig. 9 gezeigt. Auf dieser DNA-Sequenz liegen die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, wie SP1, SRF, TFIIID/TBF, AP1, AP2, BPV-E2, c-Myb, c/EBP, E1A-F, GATA-1, HNF-5, IBP-1, NF-IL6, NF-kB, SP1, T-antigen, TCF-1, v-Myb usw.

Ein Sequenzvergleich der DNA-Sequenz von Fig. 9 mit einer internationalen genomischen Sequenzdatenbank (NCBI, National Center for Biotechnology Information) ergab, daß sich Sequenzhomologien von annähernd 98% auf Chromosom 4 und 7 befinden. Es ist anzunehmen, daß der KOC-Promoter auf Chromosom 7 als Duplikat auf Chromosom 4 liegt, wobei zahlreiche chromosomale in situ Hybridisierungen sowie das Vorhandensein klassischer Exon-Intron Strukturen belegten, daß sich das funktionelle KOC-Gen auf Chromosom 7 befindet. Ferner trugen Versuche mit Restriktionsendonukleasen bzw. gezielten Deletionen (z.B. mit dem Erase-a-base Kit der Firma Promega) und anschließender Subklonierung bzw. der Verbindung der erhaltenen Subfragmente mit Reporter-Genen, vgl. hierzu vorstehende Ausführungen, dazu bei, den gesamten hinterlegten Klon in seiner Struktur aufzuklären. Auch wurden hierbei DNA-Sequenzen ermittelt, die einen kleinstmöglichen KOC-Promotor-Bereich aufwiesen.

**Beispiel 6: Der KOC-Promotor wird ausschließlich in malignen Geweben und Tumorzelllinien exprimiert.**

Es konnte gezeigt werden, daß der KOC-Promotor ausschließlich in malignen Geweben und Tumorzelllinien (z.B. Colon und Pankreas) exprimiert wird. In humanen und auch murinen adulten Geweben konnten keine KOC-Transkripte nachgewiesen werden.

Aufgrund der Tatsache, daß einer Vielzahl von KH-Proteinen eine wesentliche Funktion während der Embryogenese zukommt, wurde davon ausgegangen, daß KOC ebenfalls eine Rolle während der Embryogenese spielen könnte. Eine Northern-Blot-Analyse mit poly A<sup>+</sup>-RNA von Mäuseembryonen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigte, daß am Tag 11 der murinen Entwicklung KOC am stärksten exprimiert wird (Figur 7a). Es zeigte sich, daß während fortgeschrittener Entwicklungsstadien die KOC-Expression rapide abnahm. Um erste Hinweise für die Funktion von KOC in der Organogenese zu erhalten, wurden außerdem in situ Hybridisierungen an Mäuseembryonen unterschiedlicher Stadien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß KOC zum Zeitpunkt der Organogenese am stärksten exprimiert wird, und zwar in ZNS, Darm, Pankreas, Thymus, Niere und hämatopoetischen Organen. Während späterer Entwicklungsstadien der Maus ist die KOC-Expression auf den Thymus und das Darmepithel beschränkt, wobei KOC hauptsächlich in den intestinalen Krypten nachzuweisen ist. Zwei Tage nach der Geburt wird die KOC-Expression vollständig abgeschaltet. Aufgrund der differentiellen Genexpression von KOC im Pankreaskarzinom wurde die Expression des Proteins in der humanen Pankreasentwicklung studiert. Hierzu wurde poly(A)<sup>+</sup> RNA von humanen fötalen Pankreasgeweben der Firma "The Genetics Institute", Boston, USA verwendet. Diese wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Standardverfahren geblottet. Der Northern-Blot wurde anschließend mit einer radioaktiv markierten humanen KOC-Sonde hybridisiert. Es zeigte sich, daß KOC während der 12. Schwangerschaftswoche deutlich exprimiert wird. Die stärkste KOC-Expression war in der 18. Woche der Schwangerschaft zu beobachten (Fig. 7b).

Schließlich wurde der Transkriptnachweis noch durch RT-PCR durchgeführt, wobei sich zeigte, daß der KOC-Promotor ausschließlich in Pankreaskarzinomgewebe nicht jedoch im Pankreas bei chronischer Pankreatitis oder in gesundem Pankreas aktiviert wird. Dazu wurden Proben aus verschiedenen Geweben entnommen und direkt nach operativer Entnahme in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurde das Gewebe in einem sterilen Mörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Die RNA-Extraktion aus diesem humanen Pankreasgewebe erfolgte mit dem RNAeasy Midi Kit nach Herstellerprotokoll (Qiagen). Nach einem DNase I Verdau wurde die mRNA direkt in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden kommerziell erhältliche reverse Transkriptasen (z.B. Superscript II RT, Firma Gibco BRL) nach Herstellerprotokoll verwendet. Zur Einstellung der einzusetzenden cDNA-Menge wurden für eine interne Kontroll-PCR die Primer des sauren ribosomalen Phosphoproteins (GenBank (NCB) xs13, Acc.Nr.: Z36785 verwendet. Von diesem Protein ist bekannt, daß es in normalen, entzündlichen und malignen pankreatischen Geweben gleich stark exprimiert wird. (Forward-primer: 5'-CTGGCTAAGTTGGT TGCTTT-3'; Rückwärtsprimer: 5'-GCAGCT-GATCAAGACTGGA-3'; Anlagerungstemperatur 58°C; 18 Zyklen).

Für die eigentliche KOC RT-PCR wurden folgende KOC-Primer verwendet: Forward Primer: 5'-TGCAGTTTCCGAGTCAGTGT-3'; Reverse Primer: 5'-ATATCGGAAACCTCAGCGAG-3'; Anlagerungstemperatur 55°C; 35 Zyklen). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind in Figur 8 gezeigt. Für die einzelnen Gewebeproben ergaben sich folgende Befunde:

Normales Pankreasgewebe: 0/6 positiv;

Chronische Pankreatitis: 0/6 positiv;

Gesundes Dickdarmgewebe: 0/2 positiv;

Diverse Tumoren: 2/2 positiv;

Pankreaskarzinomgewebe: 7/7 positiv.

**Beispiel 7: Regression eines Tumors durch Verabreichung eines Adenovirus mit einer unter der Kontrolle des KOC-Promotors stehenden TNF-alpha kodierenden cDNA**

Zur Untersuchung der möglichen Eignung des KOC-Promotors zur gentherapeutischen Behandlung eines Tumors wurde als Vektor ein Adenovirus verwendet. Dazu wurde die KOC-Promotor-Sequenz funktionell durch homologe Rekombination in den adenoviralen Vektor Adenovirus Typ 5(ATCC, VR-5) kloniert, so daß das E1A Gen (das für die Replikation des Adenovirus essentiell ist) selektiv nur in KOC-positiven Zellen exprimiert wird (Ad.KOC-E1) Zusätzlich wurde die TNF-alpha-cDNA unter der Kontrolle des KOC-Promotors in dieses Konstrukt kloniert(Ad.KOC-E1/KOC-TNF); diese Vorgehensweise ist in Kurihara et al. (J. Clin. Invest. 106:763-771, 2000) detailliert beschrieben. Das Virus wurde durch eine Infektion in die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293, ATCC) hergestellt. Für die ersten Untersuchungen wurden Tumorzellen (Pankreaskarzinomzellen Panc1 oder MiaPaCa2; erhältlich von der American Type Culture Collection (ATCC)) subkutan in die Flanken von athymischen Nacktmäusen (Stamm NMR nu/nu I) injiziert. Die Tumoren wurden bis zu einer Größe von 1 cm wachsen gelassen. Nach intratumoraler Injektion des Konstrukts Ad.KOC-E1/KOC-TNF wurde eine deutliche Regression des Tumors beobachtet. Der antitumorigene Effekt dieses adenoviralen Konstruktes bestätigte sich in der histopathologischen Analyse.

Diese Ergebnisse konnten in vitro ebenfalls bestätigt werden. Zellen, bei denen der KOC-Promoter nachweislich aktiv ist (Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie Panc1 und MiaPaCa2 (American Type Culture Collection, ATCC)), wurden mit dem oben beschriebenen Vektorkonstrukt infiziert. Diese Tumorzellen gingen im Vergleich zu Zelllinien, die KOC nicht exprimieren (NIH 3T3 Fibroblasten, ATCC), in Apoptose.

Ferner wurde ein Adenovirus, bei dem die Herpes simplex Thymidinkinase

(HSV-tk) unter der Kontrolle des KOC-Promotors steht (Ad.KOC-tk, Adenovirus Typ 5) dazu verwendet, daß in KOC-exprimierenden Tumorzellen (vgl. vorstehend) nach Infektion mit diesem Virus die HSV-tk gebildet wurde und bei gleichzeitiger Gabe von Ganciclovir diese nicht toxische Substanz durch Phosphorylierung in eine toxische umgewandelt wurde, wodurch die Tumorzellen zerstört wurden.

**Beispiel 8: Einsatz von KOC als Diagnostikum zur Diskriminierung benignen und malignen Läsionen aus Biopsatmaterial**

Verschiedene Biopsatmaterialien (Gewebe/Zellen) wurden in RNA-Lysepuffer (50g Guanidiniumthiozyanat, 2,5ml 1M Natriumcitrat pH 7,0, 0,5g N-Laurylsarkosin, 0,7ml 2-Mercaptoethanol in 100ml H<sub>2</sub>O) direkt aufgenommen. Die Gesamt-RNA wurde mit dem "RNAeasy Mini Kit" (Fa. Qiagen) aus den Biopsaten isoliert. Die folgende RT-PCR-Reaktion wurde mit dem "One-Step RT PCR Kit" (Fa. Qiagen) ausgeführt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Verwendete KOC-Primer:

reverse: 5'-TGCAGTTTCCGAGTCAGTGT-3'

forward: 5'-ATATCGGAAACCTCAGCGAG-3'

Anlagerungstemperatur: 55°C, 35 Zyklen

Die amplifizierten DNA-Fragmente werden durch gelelektrophoretische Auftrennung in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.



**Beispiel 9: Stimulierung von CD8<sup>+</sup>-T Zellen gegen das KOC-Protein und Lyse von das KOC-Protein exprimierenden Karzinom-Zellen.**

**(A) Stimulierung von CD8<sup>+</sup>-T Zellen gegen das KOC-Protein**

Von einem gesunden Spender werden periphere mononukleäre Zellen gewonnen und einer sog. ELISPOT-Analyse unterzogen. Das Prinzip dieses Experimentes ist, daß Lymphozyten in Kulturgefäßen mit spezifischen Antigenen stimuliert werden. Kommt es zur Aktivierung der Lymphozyten, da diese das Antigen erkennen, setzen die aktivierten Lymphozyten Zytokine frei, die ihrerseits an spezifische Antikörper binden, welche auf der Bodenfläche der Kulturgefäße immobilisiert sind. Nach dem Auswaschen der Lymphozyten können dann die gebundenen Zytokine in den Kulturgefäßen mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, der in einer nachgeschalteten Farbreaktion sichtbar gemacht wird, nachgewiesen werden.

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden von einem HLA-A0201 positiven gesunden Probanden durch Dichtezentrifugation über einen Ficoll Paque®-Gradienten aufgereinigt. T-Lymphozyten wurden durch Abtrennung der B-Lymphozyten bzw. der Monozyten mit Hilfe Antikörper gekoppelter Magnetobeads (CD11, CD16, CD19, CD36 und CD56) (Pant T cell isolation Kit®, Milteny, Bergisch Gladbach, Germany) gewonnen. Aus 30 ml Blut wurden etwa  $2 \times 10^7$  T-Zellen gewonnen werden.

HLA-A0201 restringierte Peptide des KOC-Proteins wurden mittels eines Softwaresystems des NIH (NIH bioinformation service [[http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken\\_parker\\_comboform](http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)]) identifiziert. Es handelte sich um die nachstehenden Peptide:

**9mer Peptide:**

199 RLLVPTQFV

280 KILAHNNFV

552 KIQEILTQV

**10mer Peptide:**

33 FLVKtGYAFV

142 FQLEnFTLKV

26 KIPVsGPFLV

Die isolierten T-Zellen wurden mit T2-Zellen inkubiert, die (a) mit einem Gemisch der vorstehenden 9mer Peptide (10µg/Peptid) und (b) mit einem Gemisch der vorstehenden 10mer Peptide (10µg/Peptid) beladen worden waren. Die T-Zellen wurden über 6-Wochen jeweils wöchentlich restimuliert. Jeweils  $10^7$  T-Zellen wurden mit  $2 \times 10^6$  Peptid-beladenen T2-Zellen in 24 Lochplatten kokultiviert.

Die Reaktivität gegenüber den Peptid-beladenen T2-Zellen wurde wöchentlich bestimmt, beginnend am Tag 0 des Experiments, indem eine IFN-γ Elispotanalyse durchgeführt wurde. Am Tag 28 wurde eine Reaktivität durch das Gemisch von (a) (400 spezifische Zellen pro Million Zellen) beobachtet. Die Hauptreaktivität wurde dabei gegen das Peptid 199 (1000 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen) gerichtet. Eine schwächere Aktivität wurde gegen das Gemisch von (b) (150 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen) beobachtet. Hier zeigte das Peptid 33 die höchste Reaktivität (600 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen).

Somit wurde deutlich, daß gegen das KOC-Protein aktivierte CD8<sup>+</sup>-T Zellen stimuliert werden können.

**(B) Lyse von das KOC-Protein exprimierenden Karzinom-Zellen**

Nach einer weiteren Restimulierung wurden die aktivierten CD8<sup>+</sup>-T Zellen mit den HLA A0201 + Pankreaskarzinom-Zellen Panc1, die das KOC-Protein exprimieren, inkubiert. Als Kontrollen wurden die Nierenzellen HEK293 verwen-

det, die das KOC-Protein nicht exprimieren.  $10^6$  Panc1-Zellen wurden mit  $^{51}\text{Cr}$  ( $100\mu\text{Ci}$ ) für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  markiert und mit steigenden Zahlen an aktivierten  $\text{CD8}^+$ -T Zellen für 3 Stunden kokultiviert. Die spezifische Lyse der Panc1-Zellen wurde durch die Menge der freigesetzten Radioaktivität im Überstand bestimmt.

Es zeigte sich, daß Panc1-Zellen durch die aktivierenden  $\text{CD8}^+$ -T Zellen, nicht aber die Kontrollzellen HEK293 lysiert werden.

Patient-NR.	KOC-RT-PCR	Histo/Cyto	HISTO/CYTO
1	+	ok	Immunhisto:CEA pos, Cytoker18 pos, gering differenziertes Plattenepithelcarcinom
2	+	ok	Histologie: wenig differenziertes schleimbildendes Adenokarzinom
3		ok	Morbus Crohn
6	+	ok	Zytologie: maligne epitheliale Neoplasie
7	+	ok	Zytologie: maligne epitheliale Neoplasie
11	-	-	Zytologie: schlecht differenzierte epitheliale Neoplasie; PaCa Metastase
12	+	ok	Zytologie: maligne epitheliale Neoplasie
13	++	ok	1.Histo negativ, 1. Zyto: negativ, Laparoskopie-Histo:follikuläres. Lymphom
13II	++	ok	1.Histo negativ, 1. Zyto: negativ, Laparoskopie-Histo:follikuläres. Lymphom
14	+	ok	1.Histo: unauffällig, Zytologie: dysplastisches Leberparenchym, HCC
15		ok	keine maligne Auffälligkeit
16	+++	ok	Ösophaguskarzinom
17	+	ok	Zyto:unauffällig, CT gesteuerte Punktion:epithelialeNeoplasie in Leber, nekrotisch zerfallend
18		ok	keine maligne Auffälligkeit
19	++	ok	Rektumkarzinom
20	+	ok, s.B.	Zyto:unauffällig, inoperables BronchialCA mit Leberaumentforderung
21	++	ok	Zyto: maligne epitheliale Neoplasie, schleimbildendes AdenoCA
22	+	ok	epithel maligne Neoplasie, ColoCA vereinbar, Metastase
23	+++	ok	Kolonkarzinom
24	(+)	(-)	Hämogiom, stark blutiges Aspirat
25	++	ok	Zytologie: maligne epitheliale Neoplasie
26		ok	keine maligne Auffälligkeit
27	++	?	CEA stark positiv, Diagnose derzeit fragwürdig
28	+	ok	Zyto: maligne epitheliale Neoplasie, wenig differenziert
29	+	ok	1. Histo:negativ, 2.Zyto: mittelgrad. differenziertes Adenokarzinom

Tabelle 1

30	(+)	(-)	Hämogiom, stark blutiges Aspirat
31	++	ok	Pankreaskarzinom
32	-	ok	Punktat lag nicht in Raumforderung
33	-	ok	Zyto:Maligne epitheliale Neoplasie, Subtypisierung gelingt nicht
34	+++	ok	Zyto: Gering differenziertes Karzinom vom diffusen Typ nach Lauren
35	+	ok	Adenokarzinom
36	+	ok	Histo:negativ, Zyto:Nachtrag: schleimbildendes AdenoCA
37	+	-	nicht malignes Punktat, Klinik abwarten
38	+	?	Verdacht auf vorliegen einer Peritonealkarzinose
39	++	ok	Histo:negativ, 2.Zyto:Hepatozelluläres Karzinom
40	+	ok	Dünndarmlymphom
41	+++	ok	Zyto: maligne epitheliale Neoplasie
42	+++	ok	Zyto: maligne epitheliale Neoplasie
43	-	ok	Zyste
44	+	?	fraglich Non Hodgkin Lymphom
45	+	?	fragliche Diagnose

Tabelle 1 (Fortsetzung)

### Patentansprüche

1. DNA-Sequenz des KOC-Promotors, umfassend die in Figur 9 gezeigte Nucleinsäuresequenz oder eine davon abweichende Nucleinsäuresequenz, deren biologische Funktion im wesentlichen der des KOC-Promotors entspricht.
2. Arzneimittel, enthaltend die DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder eine DNA-Sequenz, die für ein RNA-bindendes Protein KOC mit der in Figur 1 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert.
3. Arzneimittel nach Anspruch 2, wobei die DNA-Sequenz die in Figur 1 gezeigte Nucleinsäuresequenz enthält.
4. Arzneimittel, enthaltend eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit den biologischen Eigenschaften eines von den DNA-Sequenzen nach Anspruch 2 oder 3 kodierten RNA-bindenden Proteins KOC kodiert:
  - (a) die sich von einer DNA-Sequenz von Anspruch 3 in der Codonsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet;
  - (b) die mit einer DNA-Sequenz von Anspruch 3 oder 4(a) hybridisiert; oder
  - (c) die ein Fragment, eine allelische Variante oder eine andere Variante der DNA-Sequenz von Anspruch 3, 4(a) oder 4(b) ist.
5. Arzneimittel, enthaltend einen Expressionsvektor, der eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfaßt.
6. Arzneimittel, enthaltend das RNA-bindende Protein KOC oder ein Protein

mit dessen biologischer Aktivität, das von der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 2 bis 4 kodiert wird.

7. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 2 - 6, wobei das Protein und/oder die DNA-Sequenz in einer für die Immunisierung eines Individuums geeigneten Menge vorliegen.
8. Diagnoseverfahren zum Nachweis eines mit der Expression von KOC assoziierten Tumors, bei dem man eine Probe mit einer zur spezifischen Hybridisierung mit einer von der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 2 bis 4 transkribierten mRNA geeigneten Sonde oder einem Primer oder einem KOC-Protein nach Anspruch 6 oder einem Antikörper gegen das in Anspruch 6 definierte KOC Protein oder einem Fragment davon in Berührung bringt und sodann direkt oder indirekt bestimmt, ob sich die Konzentration von KOC, KOC-mRNA, KOC-Protein und/oder anti-KOC-Antikörper in der Probe im Vergleich zu einer Kontrollprobe unterscheiden.
9. Diagnoseverfahren nach Anspruch 8 zur Differentialdiagnose zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom.
10. Diagnoseverfahren nach Anspruch 8 zur Diagnose prä maligner Läsionen bei unklaren Raumforderungen.
11. Diagnoseverfahren nach Anspruch 8 zur Risikostratifizierung bei prä malignen Läsionen.
12. Diagnoseverfahren nach Anspruch 8 zur Evaluierung von Therapieerfolgen.

13. Diagnostischer Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 7 oder 8, der eine zur spezifischen Hybridisierung mit einer von der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 2 bis 4 transkribierten mRNA geeignete Sonde oder einen Primer oder ein KOC-Protein nach Anspruch 6 und/oder einen anti-KOC-Antikörper oder ein Fragment davon enthält.
14. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung für das künstliche Herbeiführen der Pluripotenz von Körperzellen.
15. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung für die Herstellung von Geweben oder Organen über die Differenzierung von Stammzellpopulationen.
16. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung zur Hochdosis-Chemotherapie.
17. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung für die Verbesserung der ex-vivo-Expansion hämatopoetischer Stammzellen.
18. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung für die Verbesserung des Engraftments bei allogenen Knochenmarktransplantationen.
19. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung für die Verlangsamung und/oder Umkehrung von durch physiologische oder physikalische Noxen induzierte Alterungsprozesse.
20. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung zur Erzeugung eines prophylaktischen Effekts bei Chemo- oder



Strahlentherapie.

21. Verwendung nach Anspruch 20 zur Erzeugung eines prophylaktischen Effekts bei strahlenexponierter Haut.
22. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung für die Regeneration von Hautdefekten, Hautkosmetik oder zur beschleunigten Wundheilung
23. Verwendung einer in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierten Verbindung für die Immunisierung eines Individuums gegen maligne Tumoren und ihre Vorstufen.
24. Verwendung der DNA-Sequenz des KOC-Promotors oder einer davon abweichenden Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 1 zur Isolierung und/oder Anreicherung und/oder selektiven Vermehrung von Stammzellen.
25. Verwendung der DNA-Sequenz des KOC-Promotors oder einer davon abweichenden Sequenz nach Anspruch 1 zur Ermittlung des Differenzierungsgrads oder Dedifferenzierungsgrads einer Zelle oder eines Gewebes.
26. Verwendung der DNA-Sequenz des KOC-Promotors oder einer davon abweichenden Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 1 zur gentherapeutischen Krebsbehandlung.
27. Diagnostischer Kit zu einer Verwendung gemäß Anspruch 25, der eine zur spezifischen Hybridisierung mit einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 geeignete Sonde oder einen Primer enthält.

28. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die an die DNA-Sequenz des KOC-Promotors gemäß Anspruch 1 binden und dessen Aktivität modulieren, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:
- a) Inkontaktbringen einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 mit einer Testverbindung in einem zellulären Assay; und
  - b) Bestimmung der Modulierung der Aktivität des KOC-Promotors, wobei eine Modulierung anzeigt, daß die Testverbindung wirksam ist.

Fig. 1a

GGCACCCACAGATCTAGGGAAGATCTTAGCATACAGTAGAAACACAGCAA (C) TTTTGTCTTACTAAATAAAC  
 TTTATTTTCATACAGATTACTGGTAAGCAAAATATTGATATAACTCTAAGACATTAAGGATATCAGAAGACC  
 ATTCATGTTCTTTATGGGGTTCCAATTAAGAAATAAGTTGAAAAATCAGGCAAAGAAAGGAGTTCTGATGCT  
 CCTAAGTAGCATCAGAACTATTCTGATGGACTTAAGCCATTGTAAGAGTCCCAGTTTGATTCTTACCAAAAG  
 TCTCTTTCCATGAACATTATGCTTACAATCAGACAGATATAAAGCACCCTAAAGCAAACACAAACTCAAAC  
 ACTCTTAAATTTAGGTGTACATCTCATTGAAAAATTATTCAAAGCGAGACTTAGGAAGACT

1 ggtggatgcg tttgggttgt agctaggctt tttcttttct ttctctttta aaacacatct  
 61 agacaaggaa aaaacaagcc tcggatctga tttttcactc ctcggttcttg tgcttggttc  
 121 ttactgtgtt tgtgtatttt aaaggcgaga agacgagggg aacaaaacca gctggatcca  
 181 tccatcaccg tgggtgggtt taatttttcg ttttttctcg ttattttttt ttaaacaacc  
 241 actcttcaca atgaacaaac tgtatatcgg aaacctcagc gagaacgcgc cccctcggga  
 301 cctagaaagt atcttcaagg acgccaagat cccgggtgctg ggacccttc tggtgaagac  
 361 tggctacgcg ttegtggact gcccgagca gagctgggccc ctcaaggcca tcgaggeget  
 421 ttcaggtaaa atagaactgc acgggaaacc catagaagtt gagcactcgg tcccaaaaag  
 481 gcaaaggatt cggaaacttc agatacgaat tatcccgcct catttacagt gggagggtgct  
 541 ggatagttta ctagtccagt atggagtggt ggagagctgt gagcaagtga aacttgactc  
 601 ggaaactgca gttgtaaatg taacctattc cagtaaggac caagctagac aagcactaga  
 661 caaactgaat ggatttcagt tagagaattt caccttgaaa gtagcctata tccctgatga  
 721 aatggccgcc cagcaaaaacc ccttgacga gccccgaggt cgccggggggc ttgggcagag  
 781 gggctcctca aggcaggggt ctccaggatc cgtatccaag cagaaaccat gtgatttgcc  
 841 tctgcgctcg ctggttccca cccaatttgt tggagccatc ataggaaaag aaggtgccac  
 901 cattcggaac atcaccaaac agaccagtc taaaatcgat gtccaccgta aagaaaatgc  
 961 gggggctgct gagaagtcga ttactatcct ctctactcct gaaggcacct ctgcggcttg  
 1021 taagtctatt ctggagatta tgcataagga agctcaagat ataaaattca cagaagagat  
 1081 ccccttgaa gatttttagctc ataataactt tgttggacgt cttattggta aagaagggaag  
 1141 aaatcttaaa aaaattgagc aagacacaga cactaaaatc acgatatctc cattgcagga  
 1201 attgacgctg tataatccag aacgcactat tacagttaaa ggcaatgttg agacatgtgc  
 1261 caaagctgag gaggagatca tgaagaaaat caggagatct tatgaaaatg atattgcttc  
 1321 tatgaatctt caagcacatt taattcctgg attaaatctg aacgccttgg gtctgttccc  
 1381 acccacttca gggatgccac ctcccacctc agggccccc tccagccatga ctctcccta  
 1441 cccgcagttt gagcaatcag aaacggagac tgttcatcag tttatcccag ctctatcagt  
 1501 cgggtgccatc atcggcaagc agggccagca catcaagcag ctttctcgtt ttgctggagc  
 1561 ttcaattaag attgctccag cggaagcacc agatgctaaa gtgaggatgg tgattatcac  
 1621 tggaccacca gaggtcagc tcaaggctca gggaagaatt tatggaaaaa ttaaagaaga  
 1681 aaactttgtt agtctaaag aagagggtgaa acttgaagct catatcagag tgccatcctt  
 1741 tgctgctggc agagttattg gaaaaggagg caaaacggtg aatgaacttc agaatttgtc  
 1801 aagtgcagaa gttgttgtcc ctctgacga gacacctgat gagaatgacc aagtgggtgt  
 1861 caaaaataact ggtcacttct atgcttgcca ggttgcccag agaaaaatc aggaaattct  
 1921 gactcaggta aagcagcacc aacaacagaa ggctctgcaa agtggaaccac ctcaagtcaag  
 1981 acggaagtaa aggctcagga aacagcccac cacagaggca gatgccaaac caaagacaga  
 2041 ttgcttaacc aacagatggg cgctgacccc ctatccagaa tcacatgcac aagtttttac  
 2101 ctagccagtt gtttctgagg accaggcaac ttttgaactc ctgtctctgt gagaatgtat  
 2161 actttatgct ctctgaaatg tatgacaccc agctttaaaa caaacaacaa acaaaacaaa  
 2221 aaaaggggtg gggagggagg gaaagagaag agctctgcac ttccctttgt tgtagtctca  
 2281 cagtataaca gatattctaa ttcttcttaa tattccccca taatgccaga aattggctta  
 2341 atgatgcttt cactaaatc atcaaataga ttgctcctaa atccaattgt taaaattgga  
 2401 tcagaataat tatcacagga acttaaattg taagccatta gcatagaaaa actgttctca  
 2461 gttttatttt taacctagat aacctaaagg aagtgtgaa tgggtgtggc  
 2521 aggggtatta aacgtgcatt tttactcaac tactcaggt attcagtaa acaatgaaa  
 2581 gcaaaattgt tctttttttt tgaaaatttt atatacttta taatgataga agtccaaccg  
 2641 ttttttaaaa aataaattta aaatttaaca gcaatcagct aacaggcaaa ttaagatttt

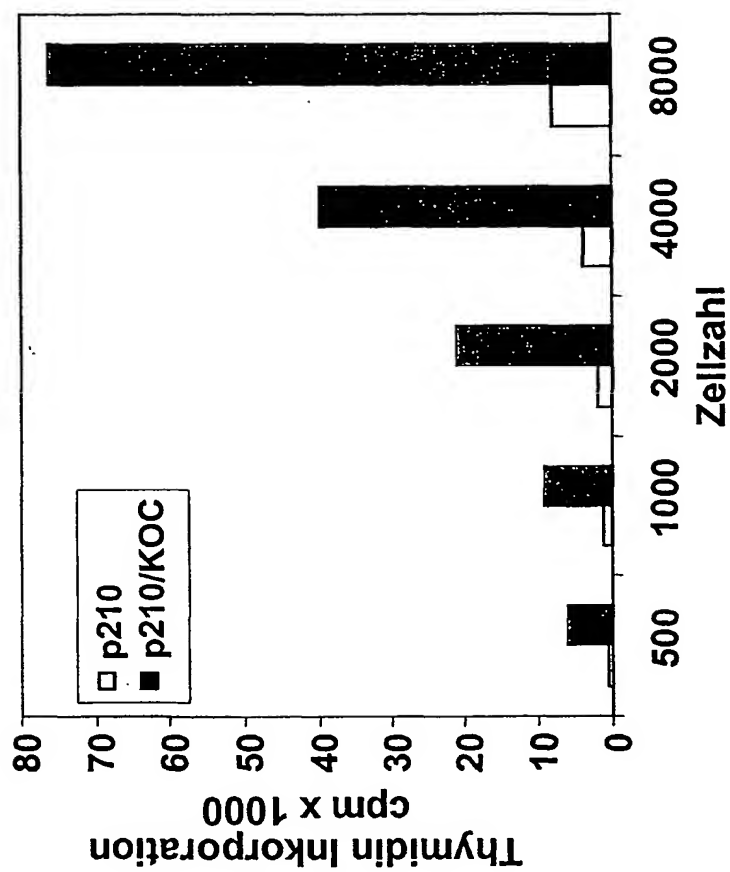
Fig. 1b

```

2701 tacttctggc tggtgacagt aaagctggaa aattaatttc aggggtttttt gaggcttttg
2761 acacagttat tagttaaatc aaatgttcaa aaatacggag cagtgcctag tatctggaga
2821 gcagcactac catttattct ttcatttata gttgggaaag tttttgacgg tactaacaaa
2881 gtggtcgag gagattttgg aacggetggg ttaaaggct tcaggagact tcagtttttt
2941 gtttagctac atgattgaat gcataataaa tgctttgtgc ttctgactat caatacctaa
3001 agaaagtgca tcagtgaaga gatgcaagac tttcaactga ctggcaaaaa gcaagcttta
3061 gcttgcttta taggatgctt agtttgccac tacacttcag accaatggga cagtcataga
3121 tgggtgtgaca gtgtttaaac gcaacaaaag gctacatttc catggggcca gcactgtcat
3181 gagcctcact aagctatttt gaagattttt aagcactgat aaattaaaaa aaaaaaaaaa
3241 aaattagact ccaccttaag tagtaaagta taacaggatt tctgtatact gtgcaatcag
3301 ttctttgaaa aaaaagtcaa aagatagaga atacaagaaa agttttnggg atataatttg
3361 aatgactgtg aaaacatatg acctttgata acgaactcat ttgctcactc cttgacagca
3421 aagcccagta cgtacaattg tgttgggtgt ggggtggtctc caaggccacg ctgctctctg
3481 aattgatttt ttgagttttg gnttgnaaga tgatcacagn catgttacac tgatcttnaa
3541 ggacatatnt tataaccctt taaaaaaaaa atcccctgcc tcattcttat ttcgagatga
3601 atttcgatac agactagatg tctttctgaa gatcaattag acattntgaa aatgatttaa
3661 agtgttttcc ttaatgttct ctgaaaacaa gtttcttttg tagttttaac caaaaaagtg
3721 ccctttttgt cactggtttc tcctagcatt catgattttt ttttcacaca atgaattaaa
3781 attgctaaaa tcatggactg gctttctggg tggatttcag gtaagatgtg ttttaaggcca
3841 gagcttttct cagtatttga tttttttccc caatatttga ttttttaaaa atatacacat
3901 aggagctgca tttaaaacct gctggtttaa attctgtcan atttcacttc tagcctttta
3961 gtatggcnaa tcanaattta cttttactta agcatttgta atttgagta tctggtacta
4021 gctaagaaat aattcnataa ttgagttttg tactcnccaa anatgggtca ttctcatgm
4081 ataatgtnc cccaatgcag cttcattttc caganacctt gacgcaggat aaattttttc
4141 atcatttagg tccccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

Fig.2



4/11

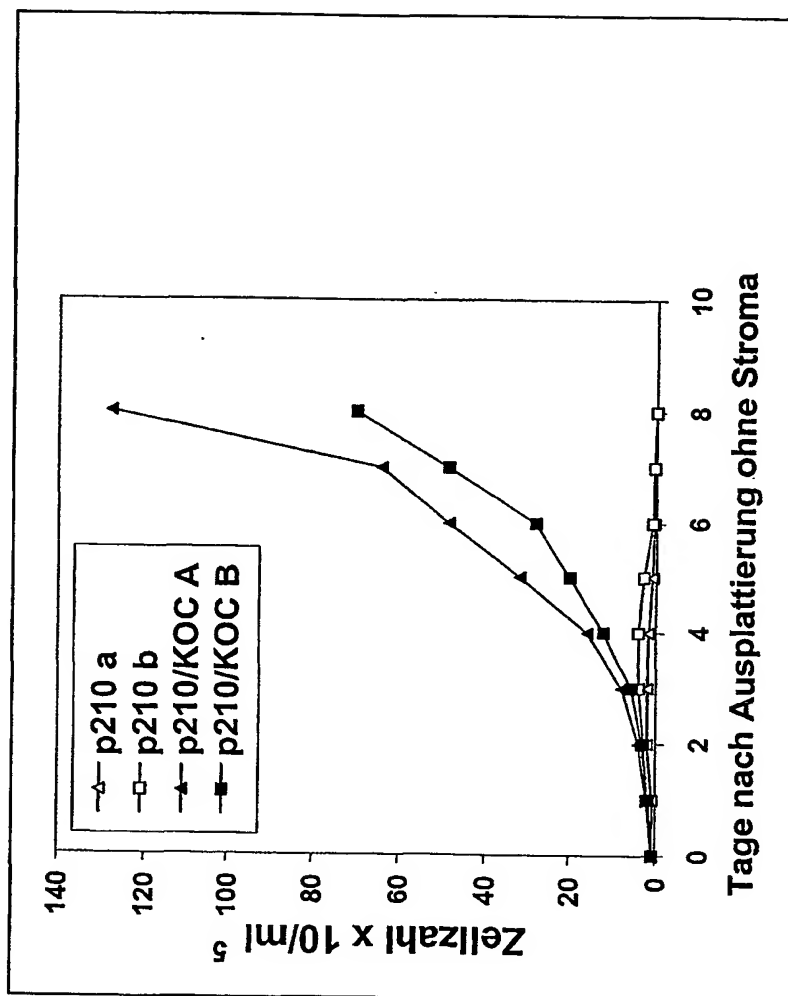
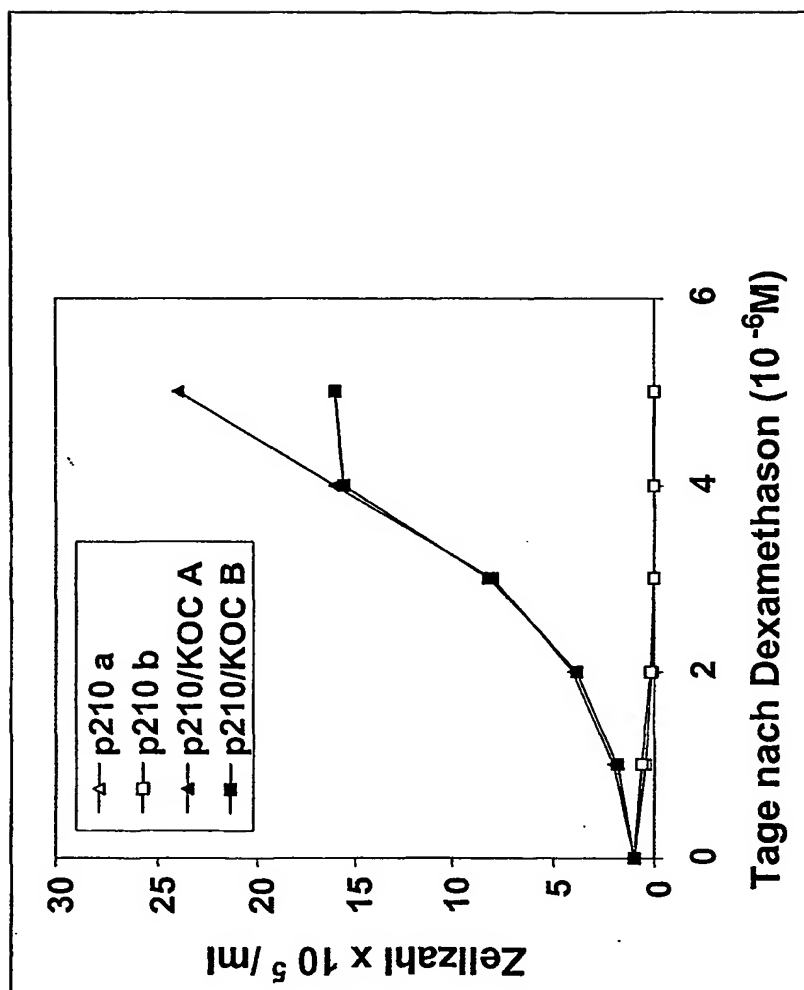


Fig. 3

Fig. 4



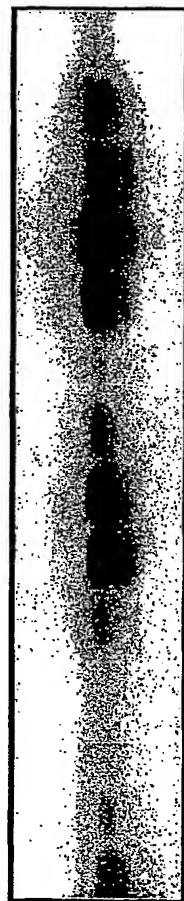
6/11

Transgene Linie

XIX

IX

Kontrollen



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 5



7/11



M = Molekulargewichtsmarker  
 1 = chron. entzündliche Darmerkrankung  
 2 = chron. entzündliche Darmerkrankung  
 3 = Oesophaguskarzinom  
 4 = Kolonkarzinom

Fig.6

# KOC Expression während der murinen Entwicklung

Tage p.c.    7    11    15    17

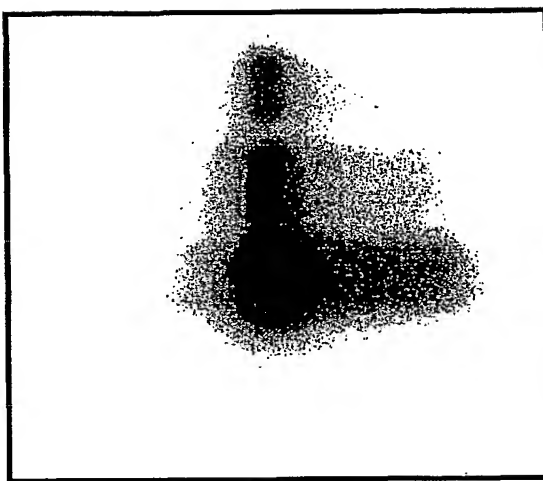


Fig. 7a

BEST AVAILABLE COPY

9/11

**BEST AVAILABLE COPY**  
**KOC Expression während der**  
**humanen Pankreasentwicklung**

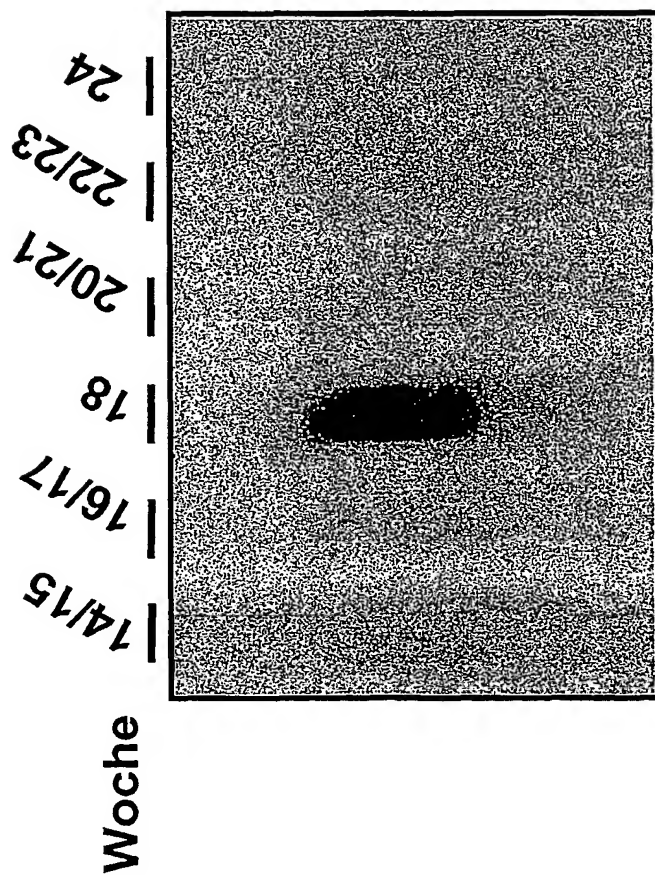


Fig. 7b

10/11

normales Pankreas    Chronische Pankreatitis    GC    1    2    3    Pankreaskarzinom



GC: gesundes Colon

- 1: Kolonkarzinom
- 2: Weichteilsarkom
- 3: Magenkarzinom

**BEST AVAILABLE COPY**

Fig. 8

Fig. 9:

**Koc promoter**

5' -

GGTTTTGAGTGGGCAGAGAATGAGCATATCACAGACATGCTTAAGACACGTTACGTGGCCTGG  
CTTACNTGATACAATTTTTTAATTTCTCTNAAGTAAACTCACTAAAATTTGAAAACATATATTT  
CTTTAGTAACCTTATTTTCATTAATTTTCTCAGGGACTTTACGGAANACATATTCAACTTTTCATT  
CATTTAATCTTACCGCAATAAATGATCTAACATATTTAGAAGACAGAGTATATAAGGTGTGCC  
CATACCCAAAGCATAGANNACTCAACAACCAGGGCCTTGAGGAAGCCAACACTAGAACAGTA  
CGAATACACAATTTTCCCTAAAATGGCGAGACTAGTGCTCACTGGGGCCCAAAGGGATGTTCA  
GGTTGCATCTTTTCGGGATTGACACCATAAAAAGAGAATTTTCTTTGGGAGCACAGTGGGGCTAA  
CTGGAGGTTTTGGTGAGTCATTTGGATGAACCTTCAGAGACAAGCATTACCCCCAAATGAGAGT  
CACGTTAAGACTTCCATGTGAGATTNTCTTAGAGGATTGTGGCCAGTTCACACATAAGAGGA  
TGGCTGTGCAGCCCAGGGAGACAGATATCTTCTCTCAGGAGCAGAAATCTTCATGTAAAAGAT  
GGCCACTTGCTGAGTAGTTGAAGCACGCCCTGATGGAACCTCTCTGGGGGTGAGATTGCACACT  
GTCTCTTGAGTTGCATAAAGCACAGAAACAATGTCTGCACTCCAGCTTCTAGCATTTACCAA  
CTCGGCAGAAAACACATCATTTGTCTATCTCATTCCAGAAAGATCTTATTTGCCGGGGGAAAAA  
AAAGTGAATTAGGCCAGGTGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGG  
CAGGCGGATCATGAGGTGAGGAGTTTGAGATCAGCATGGCCCAACATGGTTGAAACCCCGTTC  
TTTACTGAAAATACAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGTGGGTGCCCTGTAATTCCAGCTACTCA  
GGAGGCTGAGGCAGAAGAATCACTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCTAAGATCA  
CACCCTGCACTCTAGCCTGGGTGACAGAGCAAGACTGTCTCAAAAAAAAAAATAAAAGTGAA  
TGAATATAGTAGGAACCCAAGGACTGTCTAAGGGTAGGTAGTAAGTCTGCCATCACCAGAAGT  
ATTTAAATGCTGGCTAGACAATCACACTGTGGGAATAAGTTTCACTCTTTGTAAAAGGGGTAA  
ATCTTTTTCTTTGGCACCCACAGATCTAGTGAAGATCTTAGCATAACAGTAGAAACACAGCAAC  
TTTTGTTTACTAAATAAACTTTATTTTCATACAGATTACTGGTAAGCAAAATATTTGATATAAC  
TCTAAGACATTAAGGATATCAGAAGACCATTCATGTTCTTTATGGGGTTCCAATTAAGAAATA  
AGTTGAAAAATCAGGCAAAGAAAGGAGTTCTGATGCTCCTAAGTAGCATCAGAACTATTCTGA  
TGGACTTAAGCCATTGTAAGAGTCCCAGTTTGATTCCCTACCAAAAGTCTCTTTCCATGAACAT  
TATGCTTACAATCAGACAGATATAAAGCACCCTAAAGCAAACACAACTCAAACACTCTTAA  
AATTTAGGTGTACATCTCATTTGAAAATTATTCAAAAGCGAGACTTAGGAAGACTGGTTGATG  
CATTTGGGTGTAGCTAGGCTTTTTCTTTCTTTCTTTTAAAACACATCTAGACAAGGAAA  
AAACAAGCCTCGGATCTGATTTTTCTACTCCTCGTTCTTGCTGCTTGGTTCTTACTGTGTTTGTG  
TATTTTAAAGGCGAGAAGACGAGGGGAACAAAACCAGCTGGATCCATCCATCACCGTGGGTGG  
TTTTAATTTTTTCGTTTTTTCTCGTTATTTTTTTTTTAAACAACCACTCTTCACAATG

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 1, 2, 3 01/02948

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/17 C07K14/47 C12Q1/68 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 54738 A (LUDWIG INST CANCER RES) 28 October 1999 (1999-10-28)	4-13
Y	page 16, last paragraph -page 21, paragraph 3 claims 53-56, 74, 75, 88, 92, 96, 109; examples 6-8	2, 3, 14-23
Y	WO 99 46594 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 16 September 1999 (1999-09-16) page 5, line 11 -page 8, line 22 page 13, line 8 -page 15, line 9 page 33, line 21 -page 34, line 7 page 41, line 24 -page 42, line 20 claims 1-20	2, 3, 14-23
	--- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2002

Date of mailing of the international search report

04/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Goetz, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC., 01/02948

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MUELLER-PILLASCH FRIEDERIKE ET AL: "Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein." ONCOGENE, vol. 14, no. 22, 1997, pages 2729-2733, XP002118534 ISSN: 0950-9232 abstract	1,27
Y	figure 1 -----	2,3, 14-23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/02948

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9954738	A	28-10-1999	US 6297364 B1	02-10-2001
			AU 3007999 A	08-11-1999
			CN 1297531 T	30-05-2001
			EP 1071957 A1	31-01-2001
			WO 9954738 A1	28-10-1999
WO 9946594	A	16-09-1999	AU 733428 B2	17-05-2001
			AU 3069799 A	27-09-1999
			EP 1062514 A2	27-12-2000
			WO 9946594 A2	16-09-1999
			US 6255055 B1	03-07-2001



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/DE 01/02948

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/17 C07K14/47 C12Q1/68 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07K C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 54738 A (LUDWIG INST CANCER RES) 28. Oktober 1999 (1999-10-28)	4-13
Y	Seite 16, letzter Absatz -Seite 21, Absatz 3 Ansprüche 53-56, 74, 75, 88, 92, 96, 109; Beispiele 6-8	2, 3, 14-23
Y	WO 99 46594 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 16. September 1999 (1999-09-16) Seite 5, Zeile 11 -Seite 8, Zeile 22 Seite 13, Zeile 8 -Seite 15, Zeile 9 Seite 33, Zeile 21 -Seite 34, Zeile 7 Seite 41, Zeile 24 -Seite 42, Zeile 20 Ansprüche 1-20	2, 3, 14-23
	---	
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Januar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/02/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Goetz, M

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	MUELLER-PILLASCH FRIEDERIKE ET AL: "Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein." ONCOGENE, Bd. 14, Nr. 22, 1997, Seiten 2729-2733, XP002118534 ISSN: 0950-9232	1,27
Y	Zusammenfassung  Abbildung 1	2,3, 14-23

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

zur selben Patentfamilie gehören

Interne Aktenzeichen

PCT/JP 01/02948

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9954738 A	28-10-1999	US 6297364 B1	02-10-2001
		AU 3007999 A	08-11-1999
		CN 1297531 T	30-05-2001
		EP 1071957 A1	31-01-2001
		WO 9954738 A1	28-10-1999
WO 9946594 A	16-09-1999	AU 733428 B2	17-05-2001
		AU 3069799 A	27-09-1999
		EP 1062514 A2	27-12-2000
		WO 9946594 A2	16-09-1999
		US 6255055 B1	03-07-2001

**THIS PAGE LEFT BLANK**